

UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. de Pharmacie)

Année 1971

N° 8

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Françoise VILLIÉ - MONTMORY

Pharmacien

Assistant à la Faculté

Présentée et soutenue publiquement en Octobre 1971

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES DESHYDROGÉNASES

A N.A.D. :

INFLUENCE DES SUBSTRATS LACTATE

ET HYDROXYBUTYRATE

Président : M. BASTIDE, Professeur

Membres du Jury : M. TRONCHE, Professeur

M. BOYER, Maître de Conférences Délégué

Clermont-Reproduction, 64 avenue J. Noellet - AUBIERE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. de Pharmacie)

Année 1971

N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Françoise VILLIÉ - MONTMORY

Pharmacien

Assistant à la Faculté

Présentée et soutenue publiquement en Octobre 1971

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES DESHYDROGÉNASES

A N.A.D. :

INFLUENCE DES SUBSTRATS LACTATE

ET HYDROXYBUTYRATE

Président : M. BASTIDE, Professeur

Membres du Jury : M. TRONCHE, Professeur

M. BOYER, Maître de Conférences Délégué

UNIVERSITÉ DE CLERMONT

Président de l'Université : M. KOHLMULLER
Vice-Président : M. LEMOSSE
Secrétaire Général : Mme CHOPART

FACULTÉ DE PHARMACIE (U.E.R. DE PHARMACIE)

Doyen : M. COULET
Vice-Doyen : Mme GAILLARD
Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET
M. VAURS

I - Professeurs Titulaires.

MM. BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
BERGER	Chimie Analytique
CLUZEL	Bactériologie
COULET	Botanique et Microbiologie
DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
FEBVRE	Pharmacie Galénique
Mme GAILLARD	Physique Pharmaceutique
MM. POURRAT	Matière Médicale
TRONCHE	Pharmacie Chimique

II - Professeurs sans Chaire.

Mle CHATONIER	Chimie Minérale et Minéralogie
Mme POURRAT	Matière Médicale

III - Maîtres de Conférences Agrégés.

MM. ANDRAUD	Toxicologie
COUQUELET	Pharmacie Chimique
Mme PETIT	Chimie Analytique.

IV - Délégués dans les fonctions de
Maîtres de Conférences Agrégés.

M. AIACHE	Pharmacie Galénique
M. BOYER	Chimie Biologique
M. GUILLOT	Botanique.

ATTACHE PRINCIPAL : M. BERTHON
CONSERVATEUR de la BIBLIOTHEQUE : M. ARCHIMBAUD.

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentées à l'occasion d'une soutenance de Thèse de Doctorat en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation. (Délibération du 6 Juin 1956).

A ma famille

A mes Amis

AVANT-PROPOS

En ce début de travail, nous tenons à témoigner notre profonde reconnaissance à tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué.

Monsieur le Professeur BASTIDE nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son Laboratoire. Il nous a confié le sujet de cette thèse et nous a sans cesse orienté dans nos recherches. Nous tenons à le remercier pour la bienveillance dont il a toujours fait preuve à notre égard. Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous remercions Monsieur le Professeur TRONCHE qui a bien voulu faire partie de notre Jury et nous l'assurons de notre profonde reconnaissance.

Monsieur BOYER, Maître de Conférences Délégué, a contribué à la réalisation de ce travail, il a su comprendre nos difficultés et nous aider à les surmonter. Qu'il nous soit permis de lui adresser nos sincères remerciements pour l'aide qu'il a bien voulu nous apporter.

Que Monsieur COUQUELET, Maître de Conférences Agrégé, soit assuré de notre sincère gratitude.

Nous associons également à nos remerciements, tout le personnel du Laboratoire de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie qui nous apporte son appui dans le travail quotidien.

INTRODUCTION.

Parmi les déshydrogénases à N.A.D., la lactate deshydrogénase est l'enzyme qui sans conteste a suscité le plus grand nombre de recherches (108). On sait que cette enzyme catalyse la transformation reversible du pyruvate en lactate, mais peut également provoquer l'oxydation de dérivés β halogénés ou β aminés du lactate (43) et favoriser la réduction de l'hydroxypyruvate et du β_3 mercaptopyruvate (52) (73). Elle peut également agir sur d'autres acides cétones (83) ou acides alcools (77).

Parmi ces derniers substrats, le plus étudié est l'acide α hydroxybutyrique qui présente un intérêt certain en Clinique Humaine dans le diagnostic *ir vitro*, de certaines affections et intoxications. Sa transformation en acide cétone, est, en particulier, fortement augmentée par le sérum de sujets atteints d'un infarctus du myocarde.

Les nombreux travaux effectués d'une part en présence d' α -hydroxybutyrate, d'autre part en présence de lactate permirent de mettre en évidence des différences d'activités catalytiques importantes. Ces observations amenèrent certains chercheurs à penser que l'enzyme qui favorisait la transformation de l'acide α -hydroxybutyrique, n'était pas la L.D.H. mais une enzyme spécifique de ce substrat. On utilise alors le terme « α -hydroxybutyrate deshydrogénase » et il est courant aujourd'hui lorsque l'on travaille en présence de cet acide alcool, de parler d'activité « α -hydroxybutyrate deshydrogénasique ».

Cependant, pour de nombreux auteurs, la L.D.H. et l' α -H.B.D.H. sont une seule et même enzyme, les variations observées n'étant, en fait, que des différences d'affinité. Pour certains, l'activité vis-à-vis de l' α -hydroxybutyrate serait due à certaines isoenzymes de la L.D.H. Pour d'autres, toutes ces isoenzymes manifestent un pouvoir catalytique.

Devant ces résultats, dispersés et parfois contradictoires, nous avons essayé d'apporter quelques précisions sur la transformation enzymatique de ces deux substrats.

Dans notre étude bibliographique, après un exposé volontairement limité au mécanisme d'action et à la structure de la L.D.H., nous envisagerons l'étude de l'hydrogénation enzymatique de l' α -cétobutyrate. Nous exposerons enfin les principaux travaux concernant l'utilisation dans le domaine clinique du dosage de la L.D.H. et de l' α -H.B.D.H.

Dans nos recherches expérimentales, orientées par les observations précédentes, nous envisagerons successivement en utilisant le pyruvate et l' α -hydroxybutyrate comme substrats, la localisation de l'enzyme, l'étude des isoenzymes, leur variation en fonction de l'âge et l'influence d'un inhibiteur sur la réaction enzymatique.

ABREVIATIONS UTILISÉES.

L.D.H.	: Lactate deshydrogénase
α -H.B.D.H.	: α -hydroxybutyrate deshydrogénase
C.P.K.	: Créatine phospho-kinase
L.A.P.	: Leucine amino-peptidase
G.O.T.	: Glutamique oxaloacétique transaminase
G.P.T.	: Glutamique pyruvique transaminase
F.D.P.A.	: Fructose diphosphate aldolase
N.A.D.	: Nicotinamide adénine dinucléotide
N.A.D.H. + H ⁺	: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
A.D.N.	: Acide desoxyribonucléique
A.R.N.	: Acide ribonucléique.

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES.

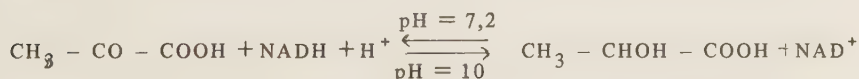
CHAPITRE I

LA LACTATE DESHYDROGENASE ET SES ISOENZYMES

(1. 1. 1. 27)

STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION.

La lactate deshydrogénase est une oxydoréductase à N.A.D.⁺ mise en évidence par THUNBERG en 1920 (145). Isolée sous forme cristallisée à partir de nombreux tissus (46, 71, 90), sa composition en acides aminés a pu être déterminée chez plusieurs espèces animales (33). Cette enzyme catalyse la transformation du pyruvate en lactate, terme ultime de la glycolyse :



L'équilibre de la réaction au pH physiologique est en faveur de la formation d'acide lactique :

$$\frac{\text{Pyruvate NADH} + \text{H}^+}{\text{Lactate NAD}^+} = 2,76. 10^{-12} \quad (125)$$

Dans le cadre de cet exposé volontairement succinct, il ne nous appartient pas de dresser une bibliographie exhaustive des travaux consacrés à l'activité : lactate deshydrogénasique. Nous renvoyons cependant le lecteur à quelques revues générales qui comportent une importante bibliographie en particulier, nous citerons les mises au point :

- Isoenzymes in Biology and Medecine by LATNER and SKILLEN, Academic Press N.Y. p. 4.
- Enzyme and Isoenzymes by SHYGAR Academic Press N.Y. p. 133
- Isoenzymes by WILKINSON - Spon London p. 43.
- Methods in Enzymology, COLOWICK and KAPLAN Academic press N.Y. 1, p. 411.
- The Enzymes by BOYER, Academic Press N.Y. , 1, p. 89.

1 - STRUCTURE.

La lactate deshydrogénase est composée de quatre protomères de poids moléculaire voisin de 35.000 (4) (18). Ces monomères sont des chaînes polypeptidiques simples que l'on rattache à deux types pouvant être distingués par leurs propriétés chimiques, physiques et biochimiques (99). Le type H (heart) se rencontre essentiellement dans le muscle cardiaque, mais aussi dans le cerveau ; le type M est particulièrement abondant dans le muscle strié et le foie. La réunion en tétramères de ces sous-unités pourra donc donner cinq isoenzymes différentes :

L.D.H ₁	L.D.H ₂	L.D.H ₃	L.D.H ₄	L.D.H ₅
H ₄	H ₃ M ₁	H ₂ M ₂	H ₁ M ₃	M ₄

Ces cinq isoenzymes sont facilement séparables par électrophorèse, la L.D.H₁ étant la plus fortement électronégative ; c'est essentiellement par des méthodes chimiques que l'on a essayé de déterminer la structure de ces enzymes et en particulier la configuration de leur site actif.

1 - Le site actif :

Les fonctions thiols.

Les premiers travaux effectués par TAKANEDA et ADAMS aux Etats-Unis (143) (1) et par PFLEIDERER en Allemagne (101) (102) mettent l'accent sur la présence indispensable de groupements thiols au niveau du site actif de la lactate deshydrogénase du coeur de Porc. Ce dernier auteur montre que le blocage d'un groupement SH par sous-unité à l'aide de N (N - acetylsulfamoyl phényl) maléinimide marquée au soufre radioactif, entraîne une perte totale de l'activité enzymatique. Le rôle de ces groupements n'est pas encore connu avec précision.

On tend aujourd'hui à distinguer des fonctions thiols « essentielles » qui contrôlent l'activité catalytique mais non la liaison du substrat ou du co-enzyme avec l'enzyme et des fonctions « secondaires », qui interviennent dans le maintien de la structure secondaire et tertiaire. Si l'on bloque uniquement la fonction essentielle, le spectre optique de dispersion rotatoire est identique à celui de l'enzyme native (63). Par contre, si la réaction affecte plus de 1,5 groupement SH par sous-unité, le spectre permet de mettre en évidence une diminution de la structure en hélice et l'on ne peut ensuite obtenir une réactivation par addition d'un excès de cystéine. Il existe une relation linéaire entre la diminution de la structure hélicoïdale et celle du pouvoir de réactivation.

On sait que les agents alkylants et acylants comme l'anhydride acétique, le N-acétyl imidazole, la 2-bromo-acétyl pyridine, attaquent rapidement les groupements thiols de la L.D.H. du coeur de Porc. Il en est de même des agents couplants comme l'acide sulfanilique diazoté. Le seul composé qui protège de façon réversible tous les groupements sulfhydrylés de l'enzyme, sans entraîner de modification visible de conformation du spectre optique de dispersion rotatoire, est le chlorure mercurique (100).

L'histidine.

En 1969, WOENCKHAUS et coll.(159) ont mis en évidence dans la même enzyme un résidu imidazole indispensable à l'activité, en utilisant de la 3- (2 bromo-1-[C ¹⁴] acétyl) pyridine. Quelques années auparavant WINER et SCHWERT (157) à la suite d'études cinétiques avaient postulé l'existence de ce groupement. La bromo-acétyl-pyridine provoque une alkylation d'un reste histidine, mais agit aussi au niveau des fonctions thiols essentielles. Cependant, si l'on bloque avant incorporation de ce réactif, les groupements SH par du chlorure mercurique, on ne peut obtenir de réactivation totale par addition de cystéine. L'utilisation d'endo-peptidases et d'exopeptidases permet d'isoler de la N [2-hydroxy-2-3-pyridyl] éthyl] histidine.

La tyrosine.

Un troisième groupement essentiel à l'activité enzymatique est probablement un reste tyrosine. Si après protection des groupements SH, on traite l'enzyme par de l'acide sulfanilique diazoté marqué au S³⁵, on observe une diminution très nette du pouvoir catalytique (63). Jusqu'à environ 65 p. 100 d'inhibition, il existe une relation linéaire entre l'incorporation du groupement azoïque et la diminution d'activité. Par extrapolation, il est possible de calculer qu'il faudrait 1,5 molécule de réactif par molécule de sous-unité pour obtenir une inhibition de 100 p. 100. Cependant, l'inhibition maxima est obtenue par couplage d'une seule molécule de tyrosine. Il reste donc une activité résiduelle de 35 p. 100 et par la suite se développe une réaction non spécifique entre le complexe azoïque-enzyme et le réactif libre. Notons que ce complexe se lie avec la N.A.D.H. de la même façon que l'enzyme native et donne le même spectre optique de dispersion rotatoire. Son spectre d'absorption en milieu alcalin correspond à celui de la monoazotyrosine que l'on peut d'ailleurs isoler à l'aide de peptidases.

La lysine.

Dans une autre série d'expériences, PFLEIDERER (98) tente de complexer les résidus lysine de l'enzyme, qui selon l'hypothèse couramment admise, assureraient la liaison avec le groupement pyrophosphate du coenzyme. Il emploie comme agent acylant l'anhydride acétique et le N acétyl-imidazole, ce dernier réagissant de façon spécifique avec les groupements hydroxylés de la tyrosine et les groupements aminés de la lysine (115). Les deux réactifs entraînent une diminution rapide de l'activité enzymatique. L'analyse permet de mettre en évidence un blocage des fonctions thiols et amine mais ne permet pas d'observer d'acétylation significative des résidus tyrosine.

L'auteur en utilisant l'hydroxylamine, qui normalement transforme rapidement les derniers O-acylés et S-acylés en acides hydroxamiques correspondants, n'observe pas d'augmentation de l'activité résiduelle dans les préparations traitées par le N-acétyl imidazole, alors que cette activité augmente si l'on a employé l'anhydride acétique comme agent acylant.

Si l'on protège les groupements SH « essentiels » par Na_2SO_3 (109), il est alors possible d'acétyler 10 des 24 groupements ξ aminés renfermés dans chaque sous-unité, sans observer une diminution de l'activité enzymatique.

2 - Type H et type M.

La lactate deshydrogénase d'origine cardiaque (H) diffère nettement de l'enzyme musculaire par sa composition en amino-acides (97) chez une même espèce animale. Cette différence de constitution est supérieure à celle observée par comparaison d'enzymes de même type, issues de diverses espèces. WIELAND (150) dès 1964, put mettre en évidence cette particularité chez le Porc et c'est sur cet animal qu'ont été effectués les travaux les plus importants. On démontra par la suite qu'il existait des différences importantes dans la structure primaire des 2 types H et M, essentiellement dans la région C terminale de la molécule.

On connaît aujourd'hui la séquence de 36 acides aminés de cette région pour l'enzyme cardiaque, les quatre derniers amino-acides étant :

— Leu — Lys — Asp — Leu

Dans l'enzyme musculaire, moins étudiée, l'extrémité C terminale a la configuration suivante .

— Glu — Leu — Gln — Phe

PFLEIDERER (103) pour comparer les types H et M fait appel à la formation de dérivés trifluoroacétylés. Ces dérivés peuvent être hydrolysés par la trypsine uniquement au niveau des liaisons peptidiques engagées par l'arginine, les groupements aminés de la lysine étant bloqués. Dans ces conditions, l'enzyme cardiaque donne trois peptides à arginine :

- un premier peptide « essentiel » renfermant la cystéine
- un heptapeptide :

Glu — Glu — Glu — Gly — Glu — Ser — Arg

- un hexapeptide :

Leu — Asn — Leu — Val — Glu — Arg

L'enzyme musculaire donne 7 peptides à arginine dont les 3 précédents et de l'arginine libre.

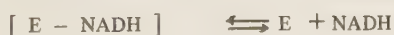
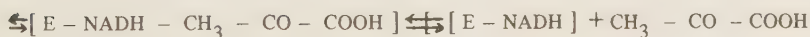
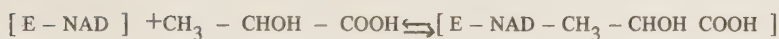
Par contre, il existe des similitudes entre ces 2 types d'enzymes au niveau du peptide « essentiel » renfermant la cystéine. Ainsi le dodécapeptide mis en évidence dans l'enzyme cardiaque de Porc se retrouve dans d'autres tissus, des différences pouvant cependant exister au niveau des acides aminés 3, 4 et 10 (85) (40). La séquence de ce dodécapeptide est la suivante :

Val — Ile — Gly — Ser — Gly — Cys — Asn — Leu
Asp — Ser — Ala — Arg.

D'autres similitudes ont été mises en évidence au niveau du peptide renfermant l'histidine.

II - MECANISME D'ACTION.

Les travaux les plus importants concernant la cinétique de la réaction enzymatique ont été publiés par SCHWERT aux Etats-Unis. Selon cet auteur l'inter-action enzyme (E) – Coenzyme – substrat peut être schématisée de la façon suivante (53) :



Une molécule de NAD^+ serait liée à environ 36.000 grammes d'enzyme, ce qui correspond à 4 molécules de NAD^+ par molécule d'enzyme. En l'absence du coenzyme, ni le pyruvate ni le lactate ne peuvent se fixer (143).

Pour mettre en évidence la liaison substrat – complexe – enzyme – coenzyme, l'auteur se heurta à deux difficultés : d'une part, cette liaison est faible, d'autre part, l'équilibre de la réaction est déplacée de droite à gauche. En faisant appel à l'oxalate et l'oxamate qui

sont respectivement des inhibiteurs compétitifs du lactate et du pyruvate (94) il peut démontrer que ces composés sont fixés par le complexe enzyme-coenzyme, alors qu'ils ne réagissent pas avec l'enzyme isolée (93) Chacun des sites susceptibles de fixer le coenzyme, fixe aussi une molécule d'inhibiteur ou de substrat.

On peut donc penser non seulement que le site du substrat existe uniquement sur le complexe enzyme — coenzyme, mais encore que chacun des deux complexes est spécifique d'un seul substrat. En fait, certains auteurs ont démontré qu'il se formait des complexes ternaires « anormaux » Enzyme NADH — lactate et Enzyme — NAD — Pyruvate (158)(44) (155) (51) mais ceci uniquement lorsque la concentration en « faux » substrat était nettement supérieure à la concentration en substrat réagissant normalement.

Selon SCHWERT, la spécificité relativement étroite du complexe E — NAD pour le lactate et du complexe E — NADH pour le pyruvate, peut être attribuée aux différences stériques existant entre les formes réduites et oxydées du NAD.

1) Rôle de l'histidine :

La réaction globale catalysée par la lactate deshydrogénase implique la libération d'un proton quand le lactate est transformé en pyruvate. Des études des paramètres cinétiques en fonction du pH, permettent à SCHWERT de tirer la conclusion qu'il existait à la surface de l'enzyme, un groupement de $pK \neq 7$ susceptible de fixer un proton (156) (132). Il propose alors une deuxième équation :



La valeur du pK du groupement accepteur permet de penser qu'il s'agit du groupement imidazole de l'histidine. Le fait que la photo-oxydation en présence de bleu de méthylène, entraîne une perte d'activité avec destruction parallèle des restes histidine, tryptophane et méthionine, sans que la fixation de NADH soit affectée (86), plaide en faveur de cette théorie. Cependant, cette observation appuie également la théorie de SCHELLENBERG (126) selon laquelle, dans l'alcool de-shydrogénase, la chaîne latérale du tryptophane est impliquée dans le transfert d'hydrogène, de la position para du NADH au carbone de l'acétaldéhyde.

Les expériences de SCHWERT déjà citées,, ainsi que de nouveaux travaux, permirent également de préciser le rôle possible des fonctions thiols et de la lysine.

2 - Rôle des groupements SH :

Comme nous l'avons dit précédemment, le rôle de fonctions thiols n'est pas encore connu avec précision. On a pu cependant démontrer que les coenzymes sont capables d'inhiber la fixation de mercuribenzoate par les groupements SH (143) (156) (122). D'autre part, si l'on traite la molécule d'enzyme par les rayons X, on observe une diminution du nombre de groupements sulfhydrilés et parallèlement une diminution d'affinité de l'enzyme pour le coenzyme.(2).

On peut donc penser que ces groupements présents au niveau du site actif de nombreuses enzymes (39) permettent la fixation du NAD ou du NADH, bien que les variations de formation de complexes enzyme-substrat en fonction du pH soient faibles et ne reflètent pas une dépendance absolue vis-à-vis d'un groupement SH ionisé (156) (132).

3 - Rôle de la lysine.

La dépendance des paramètres cinétiques de la réaction vis-à-vis du pH (132) et l'influence de ce dernier sur les valeurs de K_i pour l'oxamate et l'oxalate (158) indiquent que la liaison des substrats anioniques et des inhibiteurs est fonction d'un groupement protoné, dont le pK serait approximativement de 9,3. Ce groupement pourrait être la fonction aminée en ξ de la lysine.

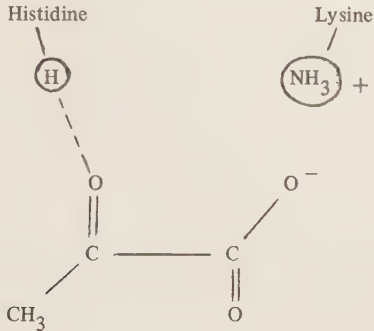
Pour essayer de confirmer cette interprétation, SCHWERT (133) traite l'enzyme par de l'O-méthyl isourée dans des conditions bien définies afin de transformer la lysine en homoarginine. Il convertit ainsi 19 des 24 résidus lysine, sans pouvoir aller plus loin car la solubilité diminue avec la guanification (36). Il fait alors les observations suivantes :

- La perte d'activité est directement proportionnelle à la fixation d'isourée.
- Cette fixation n'affecte ni la formation de complexe enzyme — substrat, ni la constante de dissociation de ce complexe.
- La constante de sédimentation de l'enzyme n'est pas modifiée.
- Les constantes de dissociation apparentes de l'oxalate et de l'oxamate à partir du complexe ternaire enzyme — coenzyme — inhibiteur diminuent, au fur et à mesure que la teneur en homoarginine augmente.
- La constante de Michaelis pour le pyruvate est indépendante de la quantité d'enzyme modifiée.

Pour SCHWERT, dans l'enzyme active, le pyruvate serait fixé au complexe enzyme — coenzyme par deux types de liaison :

- Interaction électrostatique entre le groupement carboxylique du substrat et un groupement ξ aminé de la protéine
- Liaison hydrogène entre un groupement imidazole protoné et l'oxygène du carbonyle.

Graçe à la première interaction, la liaison hydrogène se formerait selon l'angle normal à toute liaison oxygène-hydrogène



Les positions précises des deux groupements à la surface de l'enzyme, seraient sous la dépendance du changement de conformation accompagnant la fixation du coenzyme. De plus, pour satisfaire l'exigence du transfert stéréospécifique d'hydrogène (36) (74), le carbone α du pyruvate doit être adjacent à la position para de la nicotinamide.

Lorsque la lysine est remplacée par l'homoarginine, le centre de charge est déplacé vers le groupement imidazole. La liaison hydrogène entre l'oxygène du pyruvate et l'azote protoné de l'histidine, ne se ferait plus alors selon l'angle normal de la liaison oxygène-hydrogène et la réaction ne pourrait avoir lieu. Par contre, cette liaison hydrogène linéaire plus courte serait plus stable, ce qui peut expliquer la diminution du

coefficient de dissociation du complexe enzyme — coenzyme — inhibiteur observée.

Malgré ces premiers résultats, il existe de nombreuses particularités concernant le système lactate deshydrogénasique qui n'ont pas encore trouvé d'explication. C'est le cas de la sensibilité de l'enzyme aux anions mise en évidence par plusieurs auteurs (156) (50). C'est aussi le cas des anomalies cinétiques observées à pH inférieur à 7. Pour SCHWERT, ces anomalies seraient dues à la formation à faible pH, de complexes $[E^+ - NAD]$ qui ne pourraient participer à la réaction enzymatique (132).

CHAPITRE II

DESHYDROGENATION DE L'ACIDE

α -HYDROXYBUTYRIQUE

La déshydrogénation enzymatique de l'acide α hydroxybutyrique déjà signalée par TAUBER en 1949 (144) a surtout été étudiée ces dernières années.

En 1960, ROSALKI et WILKINSON (120) observent au niveau du sérum humain une réduction de l' α cétobutyrate en présence de N.A.D.H. + H^+ . Cette activité était alors attribuée à la L.D.H. mais les auteurs mettent en évidence des différences marquées entre l'action du sérum sur l' α -cétobutyrate et son action sur le pyruvate.

- La concentration optima en pyruvate est de $0,33.10^{-3}$ M alors que pour l' α cétobutyrate elle est de $3,3.10^{-3}$ M. A une telle concentration, le pyruvate est inhibiteur.
- La constante de Michaelis est de 1.10^{-4} pour le pyruvate et de $6,7.10^{-4}$ pour l' α cétobutyrate.

- Les pH optima ne sont pas les mêmes pour les deux substrats
- Les diverses fractions globuliniques du sérum, séparées par électrophorèse, n'agissent pas de façon parallèle sur le pyruvate et l' α céto-butyraté.

On peut donc penser que les variations observées sont le résultat d'une différence dans les propriétés des composants de la L.D.H. sérique ou qu'il existe dans le sérum une enzyme autre que la L.D.H. capable de réduire l' α céto-butyraté. C'est en faveur de cette deuxième hypothèse que se prononce SCHNEIDER (129) pour qui l' α H.B.D.H. est biochimiquement différente de la L.D.H.

En 1963, PLUMMER et coll. (105) publient une étude comparée de l'hydrogénation de l' α céto-butyraté et du pyruvate. Ils utilisent comme sources d'enzyme différents tissus humains ou animaux et observent souvent une activité comparable avec les deux substrats. Leurs résultats peuvent être résumés de la façon suivante :

- Les isoenzymes N.A.D. dépendantes qui catalysent la réduction de l' α céto-butyraté, ont la même mobilité électrophorétique que les isoenzymes de la L.D.H. issues des mêmes tissus.
 - Les isoenzymes rapides (isoenzymes cardiaques) semblent avoir une affinité plus grande pour l' α céto-butyraté que pour le pyruvate.
- On note le phénomène inverse avec les isoenzymes lentes.

Les dernières observations ont conduit à identifier l' α H.B.D.H. aux L.D.H. 1 et 2 (41) (95). Toutefois ELLIOT (30) (32) note simplement que la vitesse de la réaction est sensiblement identique pour l' α céto-butyraté et le pyruvate lorsque l'enzyme est d'origine cardiaque.

Ces différents résultats ont conduit de nombreux chercheurs à admettre que ces deux substrats étaient transformés par la même enzyme (124) (151), les variations observées étant dues à des différences d'affinité. C'est en effet, ce que semblent démontrer les travaux de

BALINSKY (5) qui compare les activités L.D.H. et α H.B.D.H. cardiaques chez l'Homme. Pour cet auteur, non seulement il s'agit d'une même enzyme, mais le site actif qui catalyse la réaction d'oxydo-réduction est le même pour le pyruvate et l' α cétobutyrate. Dans une publication récente, BISERTE (14) met l'accent sur cette identité.

En dehors de ces recherches essentiellement cinétiques ou structurales peu d'études ont été entreprises sur l' α H.B.D.H., en dehors du domaine clinique dont nous parlerons dans le chapitre suivant. Il faut cependant noter un certain nombre de travaux d'intérêt général concernant surtout la répartition de l'enzyme. Ainsi, ROSALKI (119) classe les activités α H.B.D.H. des différents organes humains dans l'ordre décroissant suivant : coeur, rein, muscle, foie, poumon, placenta. Cette pauvreté placentaire en enzyme est également signalée par BASTIDE (9) qui met d'autre part en évidence une activité importante au niveau des érythrocytes.

MEADE (81) (82) observe une augmentation de l' α H.B.D.H. et de la L.D.H. au cours de l'accouchement dans le sérum maternel, cependant que KONTTINEN note que ces activités sont deux fois plus élevées chez le nouveau-né que chez la mère (68).

VACCA (147) étudie les relations existant entre la L.D.H.₁ et l' α H.B.D.H. dans les hémolysats et les leucocytes par électrophorèse et absorption sur DEAE cellulose. Dans les hémolysats, il observe une activité cinq fois plus forte pour la L.D.H. que pour l' α H.B.D.H. Il semble que cette dernière ne soit pas homogène et que son activité soit différente des fractions rapides 1 et 2 de la L.D.H. Cette hétérogénéité se retrouve au niveau des leucocytes. Enfin, il faut noter que dans le sérum l'activité α H.B.D.H. est très stable, puisque CLARKE (20) n'observe aucune variation après onze semaines de conservation.

Peu d'études générales ont été effectuées chez l'animal. Il faut cependant signaler les travaux de BASTIDE (11) sur la rétine, le plasma, les hématies et les humeurs aqueuse et vitrée des bovidés. L'auteur

signale une activité α H.B.D.H. importante au niveau de la rétine. Le plasma et les hématies sont moins riches en enzyme alors que les humeurs en sont dépourvues. Par ailleurs, JONADET (62) met en évidence dans les surrénales de Lapin une répartition uniforme de l' α H.B.D.H. au niveau de la zone corticale.

Beaucoup plus nombreuses ont été les études concernant la β hydroxybutyrate deshydrogénase (1. 1. 1. 30) (81) Cette enzyme diffère nettement de l' α H.B.D.H. malgré la quasi identité du substrat et ce serait sortir de notre sujet que d'en parler en détail. Nous signalerons cependant les importants travaux de GOTTERER (48) (49) qui prépara de l'enzyme purifiée à partir du foie de rat et étudia ses propriétés générales. Cette enzyme comme la L.D.H. et l' α H.B.D.H. a pour coenzyme le N.A.D. et possède des groupements thiols indispensables au niveau de son site actif. En outre, son activité nécessite la présence spécifique de phosphatidyl cholines. Notons que ses variations en fonction de l'âge semblent opposées à celles de l' α H.B.D.H. (65).

CHAPITRE III

INTÉRÊT CLINIQUE DE LA DÉTERMINATION DE LA L.D.H. ET DE L' α H.B.D.H.

La détermination de l'activité α -hydroxybutyrate déshydrogénasique en tant que diagnostic clinique a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Les méthodes de dosages les plus couramment utilisées au niveau du sérum sont voisines de celles mises en oeuvre pour la L.D.H., l'étude des deux enzymes étant d'ailleurs souvent menée de façon parallèle (28). Les principales techniques font appel soit au dosage colorimétrique à 490 m μ de l'acide α -cétobutyrique n'ayant pas réagi (118) (136) soit à la détermination de l'oxydation du N.A.D.H. + H⁺ en U.V. à 340 m μ (135). Les valeurs physiologiques vont de 50 à 140 milliunités par ml de sérum (118), l'unité internationale étant la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une millimole de substrat par minute à 25° C.

Ces méthodes ont été employées pour diagnostiquer des affections variées. Mais c'est essentiellement en cardiologie qu'elles ont trouvé une application, notamment dans les cas d'infarctus du myocarde.

I - L'INFARCTUS DU MYOCARDE.

ELLIOT et WILKINSON (30) furent les premiers à mettre en évidence en 1961, une augmentation de l' α -H.B.D.H. au cours de l'infarctus au niveau de différents organes. L'année suivante, ils firent la même observation au niveau du sérum (31) (29). Ces résultats furent alors confirmés par les travaux de WIEME (152) et PAGLIARO (95). Selon ces différents auteurs, l'augmentation de l'activité enzymatique durerait de 10 à 15 jours. Pour KONTTINEN (67) elle serait un meilleur test que la détermination d'autres enzymes, en particulier la L.D.H. Cette dernière considération est reprise par d'autres chercheurs (121) (127) (153) (78) qui insistent sur la spécificité et la durée des variations observées.

En 1964, FORSTER (42) examine les activités L.D.H. et α -H.B.D.H. dans le sérum de trente malades venant de faire un infarctus et les compare à des sérums physiologiques. Ces deux activités augmentent régulièrement pour atteindre trois fois la valeur normale trois jours après l'infarctus et restent élevées jusqu'au douzième jour. L'étude des isoenzymes par l'inactivation par la chaleur, montre une bonne corrélation entre l' α -H.B.D.H. et la L.D.H. du myocarde (L.D.H₁). Le rapport α -H.B.D.H./L.D.H. passe de la valeur normale (0,67) à 0,80 par suite de l'élévation des isoenzymes cardiaques dans le sérum. Ces modifications observées également par NIESSEN (89) et PRESTON (107) sont alors comparées aux variations d'autres activités enzymatiques comme la créatine phosphokinase (22) (138) ou les transaminases (27).

GARBIN (45) effectue le dosage de 5 enzymes dans le sérum de 32 malades atteints d'infarctus pendant les 12 jours suivant l'attaque. Il note le temps au bout duquel les activités passent par un maximum et le temps nécessaire à un retour à la normale. Ses résultats peuvent être résumés de la façon suivante :

	Augmentation maxima	Retour à la normale
CPK	6 à 12 heures	36 à 48 heures
LDH	2 à 3 jours	10 à 12 jours
α - HBDH	1 à 2 jours	10 à 12 jours
GOT et FDPA	1 à 2 jours	4 à 5 jours

Selon cet auteur, les variations les plus significatives et les plus nettes seraient celles de la CPK et de l' α -H.B.D.H. Ces résultats sont à comparer aux observations faites par ANGELINO (3) et SCHNEIDER (130), ce dernier obtenant les valeurs suivantes :

	Augmentation maxima	Retour à la normale
CPK	16 - 18 heures	4 jours
LDH	1 à 2 jours	14 jours
α -HBDH	1 à 2 jours	11 jours
GOT	16 heures	8 jours

WELBOURN (149) et PAPADEVANGELOU (96) travaillant sur les mêmes enzymes, mettent en évidence des variations sensiblement identiques et notent en outre que le taux de G.P.T. demeure inchangé. Cette dernière particularité est également signalée par d'autres auteurs (70).

D'une façon générale, la plupart des recherches effectuées mettent en évidence l'intérêt du dosage de l' α -H.B.D.H. (57) (58) qui selon BERG (12) pourrait remplacer la détermination de la L.D.H. totale dans l'infarctus, jusqu'à ce que des méthodes plus satisfaisantes soient développées pour la séparation des isoenzymes. Toutefois, selon FORSTER (41) si l' α -H.B.D.H. augmente dans 98,9 p. 100 des cas, on trouve des chiffres assez comparables pour la L.D.H. (98 p. 100) et la G.O.T. (96,7 p. 100), qui peuvent donc également fournir des renseignements précieux.

D'autres auteurs (92) ont essayé d'établir une relation entre l'augmentation de l'activité de l' α -H.B.D.H. et l'évolution de l'électrocardiogramme. Ils observent une corrélation entre l'accroissement de l'enzyme dans le sérum et le développement de l'infarctus dans les 4 jours suivant l'attaque. La variation de l' α -H.B.D.H. peut alors être considérée comme l'expression directe de l'évolution de la nécrose du myocarde et revêt donc une valeur diagnostique importante.

En France, les principales recherches dans ce domaine sont dues à RENAIS et SCEBAT. De leurs divers travaux (110) (112), ils tirent dans une étude récente, les conclusions suivantes (111).

Si dans les nécroses myocardiques, l' α -H.B.D.H. s'élève de façon précoce, et durable, cette élévation ne correspond pas toujours à une atteinte du myocarde. Les états de chocs, les crises de tachycardie surtout ventriculaires et à un degré moindre, les efforts physiques violents entraînent des variations semblables.

L' α -H.B.D.H. n'est pas spécifique du tissu myocardique et son taux peut augmenter au cours d'affections diverses.

L'étude du rapport α -H.B.D.H. / L.D.H. n'évite pas les erreurs d'interprétation. Dans les cas litigieux, il est donc indispensable d'avoir recours au dosage simultané, d'autres enzymes, en particulier la C.P.K. et la G.O.T.

En l'absence de signes électriques de nécroses, les dosages enzymatiques permettent d'affirmer ou de rejeter l'origine myocardique des troubles observés, mais elle n'est pas toujours l'indice d'une nécrose sous-jacente.

En dehors des problèmes posés par l'infarctus, mais toujours dans le domaine de la cardiologie, il faut enfin citer divers travaux se rapportant aux greffes cardiaques. CLAUVEL et SCHWARTZ (21) (131) étudient chez le chien, les variations enzymatiques après transplantation. Ils n'observent pas d'augmentation dans les 80 jours suivant l'opération mais notent que le traitement par les globulines anti-lymphocytaires provoque vers la troisième semaine, une élévation de la L.D.H. et de l' α -H.B.D.H. Ces deux enzymes de même que la C.P.K. augmentent également dans les cas de rejets aigües.

II - LES ATTEINTES HÉPATIQUES ET LES INTOXICATIONS.

L'intérêt du dosage de l' α -H.B.D.H. et de la L.D.H. dans les affections hépatiques suscite encore de nombreuses controverses. En 1962, CUTILLO (23) met en évidence dans le sérum d'enfants de 6 à 12 mois atteints d'une hépatite à virus, une augmentation importante du taux de L.D.H. Il observe cette augmentation chez tous les malades, alors que l' α -H.B.D.H. n'est affectée que dans quelques cas. FORSTER (42) et PAPAEVANGELOU (96) obtiennent les mêmes résultats et insistent sur la diminution du rapport α -H.B.D.H. / L.D.H. qui passe de 0,65 à 0,4 et même dans certains cas à 0,2.

Plus récemment, CHEDIAK (19) note une élévation nette de l' α -H.B.D.H. sérique chez des sujets souffrants de troubles hépatiques divers : hépatite, cirrhose, cholécistite. Selon MULLER (87) les variations observées seraient tout à fait comparables à celles mises en évidence lors d'infarctus du myocarde.

Cependant, dès 1965, WEILL (148) note que dans les hépatites le taux d' α -H.B.D.H. reste toujours dans les limites normales. De même GARBIN (45) dans une étude clinique portant sur 10 hépatites virales et 10 cirrhoses, n'observe aucune augmentation de cette enzyme. Le même auteur signale en outre que les taux de L.D.H., G.O.T., F.P.D.A. et C.P.K. ne sont pas affectés.

A partir de ces résultats contradictoires, il est bien sûr difficile de se faire une opinion. La plupart des cliniciens semblent cependant admettre que les modifications enzymatiques étudiées ne sont pas spécifiques du tissu myocardique et peuvent être observées au cours d'affections diverses, en particulier les troubles hépatiques. Cependant dans ce dernier cas, les réponses peu fidèles ne permettent pas de tirer des conclusions précises quant à l'origine réelle des troubles observés.

Dans le domaine des intoxications, par contre, les résultats des différents auteurs concordent assez bien. Les observations les plus importantes ont été effectuées chez l'animal.

Chez la Souris, l'administration intra-péritonéale de tétrachlorure de carbone entraîne une forte diminution du taux d' α -H.B.D.H. dans le foie (117). Cette variation traduit de façon précise les altérations du parenchyme hépatique. Au niveau du rein, chez le même animal, le nitrate d'uranyle provoque une chute d'activité enzymatique moins accusée (8). Dans cet organe, l'activité est essentiellement localisée au niveau de la zone corticale interne et baisse au fur et à mesure que se développe une néphrite épithéliale nécrosante (146). Chez le Rat, le toxique entraîne une diminution de l'enzyme rénale de l'ordre de 50 p. 100 (7), mais une augmentation au niveau du plasma. Il n'apparaît pas de modification sensible dans les érythrocytes (8).

Il faut noter que chez l'Homme, l'administration de morphiniques à des patients cholécystectomisés provoque une élévation des taux de G.O.T., L.D.H. et α -H.B.D.H. tandis que la C.P.K. n'est pas modifiée (15). Cette élévation serait due à un spasme du sphincter d'Oddi ou des canaux biliaires.

III - ATTEINTES MUSCULAIRES.

Les variations enzymatiques qui accompagnent les dystrophies musculaires ont d'abord été étudiées au niveau du sérum. En 1962, CUTILLO (23) mesure diverses activités sériques chez des jeunes enfants atrophiques. Il trouve un taux normal de L.D.H. et d' α -H.B.D.H. alors que la L.A.P. est augmentée. Cependant, chez des sujets plus âgés, PAGLIARO (95) et ROSALKI (121) signalent une élévation importante de l' α -H.B.D.H. et les travaux plus récents (3) (154) confirment cette observation. Pour

KROSCH (70), les modifications parallèles de la C.P.K. et de l' α -H.B.D.H. seraient spécifiques des détériorations musculaires et ne seraient pas influencées par des atteintes hépatiques secondaires.

Au niveau du muscle, la distribution histochimique des enzymes n'est pas modifiée. Cependant, dans le muscle dystrophique, la réaction de l' α -H.B.D.H. est beaucoup plus importante que dans le muscle normal (134). JOHNSTON (59) chez deux familles affectées de dystrophies musculaires héréditaires graves, note une augmentation nette de C.P.K., aldolase et α -H.B.D.H. Chez les sujets atteints, le rapport α -H.B.D.H./L.D.H. est nettement supérieur à la normale, alors que chez les individus ne présentant pas les signes cliniques de la maladie, il est intermédiaire entre le rapport physiologique et celui des malades. Il semble enfin que dans les myopathies, la L.D.H. et l' α -H.B.D.H. qui normalement sont localisées au niveau des β et γ globulines, se lient en partie aux α -globulines (88).

IV - AFFECTIONS DIVERSES.

L'étude de l' α -H.B.D.H. en tant que diagnostic clinique ne s'est pas limitée à l'infarctus du myocarde, aux troubles hépatiques et musculaires mais a fait l'objet de nombreux travaux d'orientation très différente (66). Dès 1964 SCHNEIDER (128) met en évidence dans le sérum de sujets atteints de tumeurs malignes une augmentation de la L.D.H. et de l' α -H.B.D.H. Il fait ensuite la même observation chez les leucémiques (129). Il semble que dans ce dernier cas, les variations affectent surtout les isoenzymes 2, 3 et 4 de la L.D.H. alors que dans les tumeurs malignes, elles portent essentiellement sur la L.D.H.₁ (139). Dans le cas des tumeurs hépatiques, on observe une évolution enzymatique tout à fait comparable à celle des cirrhoses ou hépatites (55).

Le dosage de la L.D.H. et de l' α -H.B.D.H. peut également être appliqué au diagnostic des anémies (142) EMERSON (34) à partir d'une étude clinique portant sur 95 malades souffrant de désordres hématologiques, tire les conclusions suivantes :

- Les taux sériques d α -H.B.D.H. et de L.D.H. augmentent fortement dans la plupart des anémies mégalo-blastiques, où l'on observe parallèlement une diminution de la teneur en vitamine B₁₂ et acide folique.
- L'augmentation reste modérée dans les anémies hémolytiques comme le signale par ailleurs KINGSLEY (64).
- Dans le premier cas il existe une relation linéaire entre les variations de L.D.H. et le taux d'hémoglobine, alors que dans le deuxième cas ces deux facteurs évoluent de façon indépendante.

Dans les anémies ferriprives, il n'y a aucune modification enzymatique.

D'autres chercheurs rapportent des variations de la L.D.H. et de l' α -H.B.D.H. dans des affections aussi diverses que l'artériosclérose, l'arthrite, la néphrose, les phénomènes allergiques ou le tétanos. Ainsi, SANWALD (123) note que l'activité de l' α -H.B.D.H. est plus faible dans le tissu artériosclérotique que dans le tissu normal d'un même spécimen aortique. HENDRICH (54) examinant le sérum et le liquide synovial de malades souffrant d'arthrites rhumatismales, isolées ou inflammatoires, observe dans tous les cas une augmentation de la L.D.H., alors que l' α -H.B.D.H. n'est modifiée que dans les deux premiers cas. Dans la néphrite expérimentale, de RITIS (116) signale une chute de l' α -H.B.D.H. rénale de l'ordre de 25 p. 100. SITZMANN (137) dans une étude clinique portant sur 25 enfants ayant fait une réaction allergique au vaccin de Sabin met en évidence dans les sécrétions vésicantes une forte activité L.D.H. et α H.B.D.H. Enfin, STIRNEMAN (141) compare tétanos clinique et expérimental : chez les malades il apparaît une élévation importante du taux sérique d' α -H.B.D.H. entre le 9ème et le 12ème jour. Si l'on provoque chez le lapin le tétanos par injection intraveineuse de toxine, α -H.B.D.H. et L.D.H. augmentent au bout de 1 à 3 jours pour revenir à la normale en 15 jours environ. Chez le même animal, l'administration intra-veineuse d'endotoxine (*Escherichia Coli*) entraîne les variations quantitativement comparables mais plus rapides et moins durables (69). Il est à noter que chez l'Homme, la centrophénoxine provoque des phénomènes identiques, l' α -H.B.D.H. étant plus affectée que la L.D.H. (25).

Enfin, il faut signaler les travaux de NORNUNG (91) sur les variations enzymatiques provoquées par le cobalt 60 et les rayons X chez l'animal. L'auteur détermine la L.D.H. et l' α -H.B.D.H. dans le foie, le coeur, la rate et le sérum de 100 Rats blancs après irradiation. Les rayons X provoquent une chute de l'activité des deux enzymes dans le sérum et la rate. Dans le coeur et le foie, l'activité de l' α -H.B.D.H. diminue alors que celle de la L.D.H. augmente. Des résultats semblables mais légèrement plus élevés, sont observés après irradiation au cobalt 60.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

Dans nos recherches expérimentales, nous présenterons d'une part, les méthodes de dosage auxquelles nous avons fait appel :

- Technique d'étude des activités lactate déshydrogénasique et α -hydroxybutyrate déshydrogénasique.
- Technique de séparation des isoenzymes de la lactate déshydrogénase et de l' α -hydroxybutyrate déshydrogénase.
- Technique de dosage des acides désoxyribonucléiques et ribonucléiques.
- - Technique de dosage des protéines selon la méthode de Gornall.

Ces techniques nous permettent de comparer les activités enzymatiques en les rapportant à des constantes biochimiques.

D'autre part, nous rapporterons les principaux résultats expérimentaux :

- Répartition comparée de l' α -hydroxybutyrate déshydrogénase et de la lactate déshydrogénase et de leurs isoenzymes dans les différents organes chez le Rat.
 - Localisation enzymatique et isoenzymes dans le coeur de Rat.
 - Variations enzymatiques et isoenzymatiques en fonction de l'âge.
 - Action d'un effecteur nitrate d'uranyle sur les isoenzymes rénales et plasmatiques chez le Rat.
-

A - METHODES EXPERIMENTALES.

CHAPITRE I

DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

LACTATE DESHYDROGENASIQUE -

α - HYDROXYBUTYRATE DESHYDROGENASIQUE.

I - ACTIVITÉ LACTATE DESHYDROGENASIQUE.

La lactate déshydrogénase catalyse la réaction :



Plusieurs méthodes de dosage ont été décrites. Nous avons utilisé celle de BERGER et BROIDA (13), reprise par CABAUD et WROBLEWSKI (16) modifiée par BASTIDE et coll. (10).

Principe :

A pH 7,8 , la lactate déshydrogénase transforme en présence de N.A.D.H.₂ l'acide pyruvique en acide lactique et N.A.D. L'acide pyruvique restant réagit avec la 2.4 dinitro-phénylhydrazine pour former une hydrazone colorée, appréciée à 400-500 mμ en milieu sodique. Les autres composés sont incolores.

Réactifs :

- *Tampon phosphates à pH = 7,8 (Soerensen).*

Solution A = PO₄H₂K M/15 à 9,078 g/l.

Solution B = PO₄HNa₂ 12 H₂O M/15 à 23,870 g/l.

Mélanger 91,5 ml de B et 8,5 de A pour 100 ml de tampon.
Vérifier le pH.

- *Solution de pyruvate de sodium à 110 mg/l. soit 0,001 M.*

Faire la solution dans le tampon soit 11 mg de pyruvate dans 100 ml de tampon. Se conserve moins de 2 semaines.

- *Solution de diphospho pyridine-nucléotide réduit à 10 mg pour 1 ml d'eau distillée.*

Utiliser 0,1 ml de solution de D.P.N.H. dans chaque tube à incuber. Faire cette solution dans un bain de glace et l'utiliser immédiatement, ne se conserve pas. Stocker le D.P.N.H. en chambre froide dans des flacons bien bouchés.

- *Solution de soude 0,4 N (à 16 g/l).*

- *Solution de 2-4 dinitro-phényl-hydrazine*

2.4. D.N.P.H. 200 mg

HCl concentré 85 ml

Eau distillée q.s.p. 1 litre de réactif

Conserver à 4° C à l'obscurité.

Mode opératoire:

Introduire dans chaque tube 1 ml de solution de pyruvate de sodium et placer quelques secondes à 37° C. Ajouter ensuite 0,1 ml de solution enzymatique et 0,1 ml de N.A.D.H.₂ Agiter. Incuber au bain-marie à 37° C pendant 30 minutes.

Au terme de l'incubation, ajouter 1 ml de solution de 2-4 dinitro-phényl-hydrazine qui arrête la réaction et développe la coloration. Agiter doucement. Attendre 20 minutes à la température du laboratoire puis ajouter 10 ml de soude 0,4 N. Agiter. Passer au photocolorimètre à 525 mμ , 5 minutes au minimum après addition de soude, 30 minutes au maximum.

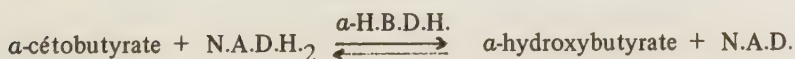
Etalonnage :

L'étalonnage est effectué en utilisant une solution de pyruvate de sodium à 0,001 M ; répartir dans des tubes à essai 0, 0,1, 0,2 ... 1 ml de solution de pyruvate et 1,2 , 1,1 , 1 , 0,2 ml d'eau distillée et traiter comme précédemment ; ce qui correspond à 100 , 90 , 10 , 0 pour cent d'activité.

Aucune réduction spontanée de pyruvate en lactate n'est apparue

II - ACTIVITÉ α- HYDROXYBUTYRATE DÉSHYDROGENASIQUE.

L' α-hydroxybutyrate déshydrogénase catalyse réversiblement la réaction :



La technique de dosage utilisée est une adaptation de celle décrite par ROSALKI (119).

Principe :

L' α -cétobutyrate est réduit par l' α -H.B.D.H. en présence de N.A.D.H.₂ en α -hydroxybutyrate, la réaction est stoppée par addition de 2-4 dinitrophényl hydrazine qui réagit avec l' α -cétobutyrate restant pour former l'hydrazone α -cétobutyrique ; celle-ci se colore en jaune brun en milieu alcalin ; cette coloration est examinée au photocolorimètre à 490 m μ .

La préparation des réactifs et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits pour la lactate déshydrogénase, le substrat utilisé étant de l' α -cétobutyrate de sodium à 0,001 M..

III - EXPRESSION DES RESULTATS.

Sur les différents tableaux, figureront :

- le taux de dilution de l'homogénat
- la moyenne arithmétique M des résultats expérimentaux obtenus
- le calcul de la limite de distribution de student à 95 p. cent établi selon la formule :

$$a = t \sqrt{\frac{\sum (M - Mo)^2}{n (n - 1)}}$$

dans laquelle :

- Σ = somme
- M = moyenne arithmétique des résultats
- Mo = résultat partiel
- n = nombre d'expériences.

Les différentes valeurs de t en fonction de n sont données par la table de Student à 95 p. cent.

CHAPITRE II

SEPARATION DES ISOENZYMES.

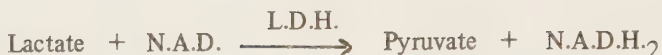
Les isoenzymes de la lactate déshydrogénase sont maintenant bien connus. On sait que la L.D.H. peut être séparée en 5 isoenzymes : L.D.H.₁ , L.D.H.₂ , L.D.H.₃ , L.D.H.₄ , L.D.H.₅ classés suivant leur mobilité électrophorétique à pH 7,9, la L.D.H.₁ étant la plus fortement électronégative.

Les 5 isoenzymes correspondant à la combinaison de deux différentes sous-unités : « H » : sous-unité de type cardiaque et « M » : sous-unité de type musculaire en tétramères.

Pour séparer ces isoenzymes, nous avons utilisé la méthode suivante :

Principe :

Après migration différentielle sur membrane d'acétate de cellulose à l'aide de l'électrophorèse microzone Beckman, les isoenzymes sont révélés selon la technique de FISCHER et coll. (37) en utilisant un gel d'Agar-agar dans lequel est incorporé le substrat : lactate de sodium.



Le N.A.D.H.₂ par l'intermédiaire du méthosulfate de phénazine qui joue le rôle de transporteur d'électrons, réagit avec le nitro bleu tétrazolium donnant un diformazan dont la coloration est appréciée à 680 mμ

Réactifs :

1 - Tampons :

A) Tris HCl 0,2 M pH = 8,3 : dissoudre 24 g de tris 7 - 9 dans 700 ml d'eau distillée. Ajouter HCl concentré jusqu'à pH = 8,3 puis compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.

B) Tampon barbital :

Véronal	2,76 g
Véronal sodique	15,40 g
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

C) Tampon Tris HCl Barbital : mélanger à volumes égaux A et B. Conserver au froid et s'en servir immédiatement à la sortie du réfrigérateur.

2) Gel.

Pour une plaque de 20 ml.

- 0,5 g difco special Noble Agar
- 14 ml tampon tris HCl
- 0,4 ml lactate de sodium (à 60 p. cent sirop)
- 4 ml nitro bleu tétrazolium (1 mg/ml dans H₂O distillée)
- 0,4 ml de méthosulfate de phénazine (1 mg/ml dans H₂O distillée)
- 20 mg d'adénine nicotinamide dinucléotide dissous au moment de l'emploi dans 1,2 ml d'eau distillée.

Dissoudre l'agar dans le tampon tris HCl en chauffant au bain-marie à 70° C environ, 40 minutes, puis ajouter en remuant le lactate le nitro bleu tétrazolium, le méthosulfate de phénazine, le N.A.D.

Couler dans un bac et laisser se solidifier à l'obscurité à température de la pièce.

3) *Solution de rinçage.*

200 ml d'acide acétique à 10 p. cent.

Technique.

1) *Préparation des échantillons.*

a) Le sang :

Le sang est prélevé par ponction cardiaque.

- une partie est recueillie sans utiliser d'anticoagulants puis centrifugée ; le sérum ainsi recueilli doit être clair et non hémolysé ; le sérum est conservé à la température ambiante..
- une partie est recueillie sur héparine, centrifugée, le plasma et les globules blancs sont éliminés ; les hématies sont lavées trois fois au sérum physiologique, chaque lavage s'accompagnant d'une centrifugation. Les hématies sont recueillies après élimination du sérum physiologique surnageant.

b) les organes :

- les organes sont homogénéisés puis centrifugés à 14 000 t/mn puis le surnageant de centrifugation est amené à dilution convenable.

2) *Mode opératoire.*

Remplir la cuve microzone avec le tampon tris HCl réfrigéré. Mouiller la membrane avec le même tampon, l'essorer, la placer sur le pont et attendre 2 minutes afin d'obtenir l'équilibre membrane-cuve.

Puis faire les applications en prenant la plage centrale. L'électrophorèse dure 40 minutes à 150 volts avec le sélecteur mis à 0.300 « constant voltage ». Tester le courant qui ne doit pas excéder 8 mA en fin d'opération.

Lorsque la migration est terminée, couper environ 3 cm à chaque extrémité de la membrane alors que celle-ci est encore sur le pont. Retirer rapidement la membrane et la placer sur le gel en évitant de bloquer les bulles d'air. Incuber à l'étuve à 37° C pendant 30 minutes.

En fin d'incubation, on rince rapidement la membrane à l'eau, frotter légèrement avec le doigt pour retirer le dépôt adhérent. Placer la membrane dans l'acide acétique à 10 p. cent, 2 minutes en agitant. La plaque doit devenir blanche. Essorer et placer la membrane entre deux buvards, puis sécher le tout à l'étuve pendant plusieurs heures. Conserver les membranes à l'obscurité car les zones tendent à pâlir.

Lire à 680 m μ à l'aide du densitomètre.

Remarque :

Pour l' α -hydroxybutyrate déshydrogénase, nous avons suivi scrupuleusement la même méthode en remplaçant la solution de lactate par une solution d' α -hydroxybutyrate de sodium.

ORGANES	DILUTIONS		NOMBRE D'APPLICATIONS	
	α HBDH	LDH	α -HBDH	LDH
Coeur	1/60	1/100	1	1
Foie	1/20	1/300	1	1
Reins	1/10	1/50	1	1
Muscle	1/25	1/300	1	1
Cerveau	1/10	1/75	1	1
Plasma	pur	pur	5	2
Hématies	1/2	1/10	1	1

DILUTIONS EMPLOYEES ET NOMBRE D'APPLICATIONS
CHEZ LE RAT

CHAPITRE III

DOSAGE DES ACIDES DESOXYRIBONUCLÉIQUE ET RIBONUCLÉIQUE

Après extraction, l'acide désoxyribonucléique est dosé par la réaction à la diphénylamine et l'acide ribonucléique par la réaction à l'orcinol.

I - EXTRACTION DANS LES TISSUS.

Méthode de SCHNEIDER modifiée par KULKA (72)

Les tissus sont homogénéisés dans 20 à 100 volumes d'acide trichloracétique à 5 p. 100 selon la teneur en A.D.N. ou A.R.N. Laisser ensuite une heure à 0° C puis centrifuger à 450 g (1500 à 2000 t/mn.) pendant cinq minutes, décanter le surnageant. Le précipité est remis en suspension (pour le laver) avec un volume d'acide trichloracétique à 5 p. 100 égal à celui utilisé pour l'homogénat. Centrifuger, décanter le surnageant. On garde à 20° C le précipité si on veut le conserver avant

l'analyse ou on l'utilise extemporanément. Le précipité est alors traité rigoureusement avec la même dilution que celle utilisée pour faire l'homogénat soit 20 à 100 volumes d'acide trichloracétique à 5 p. 100. Porter le tout à 90° C pendant 15 minutes. Centrifuger à 450 g pendant cinq minutes. Doser l'A.D.N. et l'A.R.N. sur le surnageant ou sur des dilutions de ce surnageant.

II - DOSAGE DE L'A.D.N. selon DISCHE (26)

Principe.

La diphénylamine donne une coloration bleue avec les 2 déoxyribose.

Réactifs.

- *Réactif de Dische à la diphénylamine.* Dissoudre 1 g. de diphénylamine dans 100 ml d'acide acétique glacial très pur et ajouter 2,75 ml de SO_4H_2 concentré pur à 100 ml de solution de diphénylamine (se conserve peu, refaire tous les 2 jours).

- Solution étalon d'A.D.N. à 0,10 g p. 100 dans l'eau distillée (conserver à + 4° C) (A.D.N. polymérisé NBCO).

Mode opératoire.

Mélanger 2 ml de solution d'A.D.N. avec 4 ml de diphénylamine Chauffer à 100° C pendant 10 minutes. On obtient une coloration bleue stable, laisser refroidir et mesurer au photocolorimètre à 595 m μ .

L'étalonnage est réalisé en utilisant 0, 0,4 , 0,8 , 1,2 , 1,6 , 2 ml de solution d'A.D.N. étalon dilué au 1/2 dans l'acide trichloracétique et de l'eau distillée q.s.p. 2 ml. Ce qui correspond à 0, 0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,4 , 0,5 mg d'A.D.N. dans 1 ml de solution à doser.

III - DOSAGE DE L'A.R.N. par la réaction à l'orcinol selon MEJBAUM (84)

Principe.

Le dosage de l'acide ribonucléique est basé sur la réaction du pentose (ribose) avec l'orcinol en présence d'un catalyseur FeCl_3 employé par BIAL. Il existe plusieurs modifications se rapportant aux concentrations en HCl , FeCl_3 et orcinol. Celle proposée par MEJBAUM est une des plus employées.

Réactifs.

- *Réactif de Mejbaum à l'orcinol* (à refaire tous les jours) modifié comme suit : solution mère de FeCl_3 : 1 ml sol. FeCl_3 (Prolabo R.P. à 28 p. 100 , $d = 1,26$) dans q.s.p. 10 ml d' HCl concentré.

Mélanger : 1,7 ml de solution mère ainsi obtenue : 0,100 g d'orcinol très pur : HCl concentré q.s.p. 100 ml.

- *Solution aqueuse étalon d'A.R.N.* : (NBCO Ribose, nucléic acid reagent grade NBCO, flacons 25 g : P.M. = 1303,8 ; N = 16,3 ; P = 9,5 ; N/P = 1,7) à 0,050 g p. 100, pour dissoudre, mettre 5 ml de NaOH N/10.

Mode opératoire.

A 2,5 ml de solution d'A.R.N., ajouter 2,5 ml de réactif ; porter 20 minutes au bain marie bouillant. On obtient une coloration verte. Refroidir et mesurer l'absorption à 670 μ

L'étalonnage est réalisé en utilisant une dilution au 1/2 dans l'acide trichloracétique à 10 p. cent de la solution étalon d'A.R.N. les volumes employés de 0, 0,5 , 1 , 1,5 , 2 , 2,5 ml sont additionnés de H_2O distillée q.s.p. 2,5 ml. Cette gamme correspond à 0, 0,05, 0,10, 0,15 , 0,20 , 0,25 mg d'A.R.N. dans 1 ml de solution à doser.

Calculs.

Dans un surnageant contenant A.D.N. et A.R.N., il faut soustraire de la coloration verte totale donnée par l'orcinol la densité optique qui revient à l'A.D.N. pour cela : effectuer la réaction à l'orcinol sur une gamme d'A.D.N. en se rapportant à cette courbe, chercher quelle densité optique donne à l'orcinol l'A.D.N. trouvé pour cette dilution et la déduire de la densité totale trouvée par la réaction à l'orcinol.

CHAPITRE IV

DOSAGE DES PROTEINES BIURÉTIQUES.

Outre les dosages d'A.D.N. et d'A.R.N. précédemment décrits, nous avons effectué comme dosage de référence au niveau des différents organes du Rat, celui des protéines biurétiques par la méthode de GORNALL décrite par FLEURY (38).

Principe.

Les protéines biurétiques donnent en présence du réactif cuprotartrique, une coloration violette stable appréciable au photocolorimètre à 540 m μ .

Réactifs.

1) *Solution protéique à concentration convenable* (0 à 6 g. p. litre)

2) Réactif cuprotartrique de GORNALL :

- | | |
|--|--------|
| - Sulfate de cuivre | 1,5 g. |
| - Tartrate double de sodium et de potassium | 6 g. |
| - Soude en pastilles exempte de carbonate (soude
+ eau à parties égales, filtrer) | 30 g. |

- Iodure de potassium 1 g.
- Eau distillée q.s.p. 1000 ml

Mode opératoire.

Mélanger : 2 ml de solution de protéines et 8 ml de réactif de GORNALL. Abandonner 30 minutes à la température du laboratoire. Apprécier la coloration au photocolrimètre à 540 m μ .

Un tube témoin est préparé en remplaçant la solution à doser par une quantité équivalente d'eau distillée.

Etalonnage.

La déviation obtenue est comparée à celle des tubes témoins d'une gamme-étalon en solution d'albumine à 1/100, réactif Stalabo, soit quatre tubes renfermant chacun 2 ml de cette solution d'albumine diluée respectivement au 1/2 , 1/4 , 1/6 , 1/12 et 8 ml de réactif de GORNALL.

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX.

CHAPITRE I

REPARTITION COMPARÉE DE L' α -H.B.D.H. et de la L.D.H. ET DE LEURS ISOENZYMES DANS LES DIFFÉRENTS ORGANES CHEZ LE RAT.

Afin d'étudier la répartition chez le Rat, les différents organes ont été prélevés, pesés et homogénéisés à « l'ultra-Turrax » puis amenés aux dilutions convenables. Sur ces organes, ont été réalisés : les dosages enzymatiques (lactate déshydrogénasique, α -hydroxybutyrate deshydrogénasique) ainsi que les mesures des teneurs en protéines, en A.D.N. en A.R.N. et les séparations électrophorétiques.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Les dosages des activités enzymatiques (L.D.H. , α -H.B.D.H.) ont été effectués sur plusieurs dilutions de l'homogénat et avec deux temps d'incubation (30 et 60 minutes). Nous n'avons conservé pour l'expression des résultats que la dilution correspondant à l'activité optimum.

Les activités concernant le coeur, le muscle, le foie, les reins et le cerveau figurent respectivement dans les tableaux I, II, III, IV, V. Les activités enzymatiques sont exprimées en micromoles de substrat métabolisé par gramme de tissu frais et par minute. Les taux de protéines, d'A.D.N., d'A.R.N., sont exprimés en mg par gramme de tissu frais.

Pour chaque organe, les zymogrammes ont été réalisés aux dilutions indiquées au chapitre II de la partie précédente.

α -H.B.D.H. 1/400	μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu par minute	M	a
L.D.H. 1/800			
protéines 1/50			
A.D.N. 1/25	mg par g de tissu frais	2,65	0,12
A.R.N. 1/25			

TABLEAU I - Activités enzymatiques (L.D.H. , α H.B.D.H.) et taux de protéines A.D.N. , A.R.N. dans les homogénats de coeur de Rat.

α H.B.D.H. 1/400	μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu par minute	M	a
L.D.H. 1/4000			
Protéines 1/100	mg par g de tissu frais	188,0	9,2
A.D.N. 1/50			
A.R.N. 1/100			

TABLEAU II - Activités enzymatiques (L.D.H., α H.B.D.H.) et taux de protéines A.D.N., A.R.N. dans les homogénats de muscle de Rat.

α H.B.D.H. 1/400	μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu par minute.	M	α
L.D.H. 1/1000			
Protéines 1/100	mg par g de tissu frais	195,0	9,7
A.D.N. 1/50			
A.R.N. 1/100			

TABLEAU III - Activités enzymatiques (L.D.H., α -H.B.D.H.) et taux de protéines A.D.N., A.R.N. dans les homogénats de foie de Rat.

α H.B.D.H. 1/400	μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu par minute	M	α
L.D.H. 1/800			
Protéines 1/100			
A.D.N. 1/50	mg par g de tissu frais	178,0	20,5
A.R.N. 1/100			
		6,6	0,3
		10,9	0,5

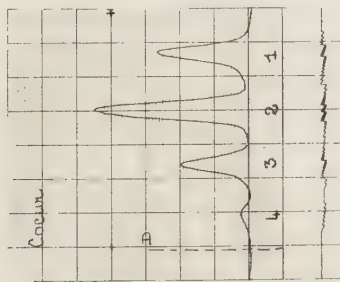
TABLEAU IV - Activités enzymatiques (L.D.H. , α H.B.D.H.) et taux de protéines A.D.N., A.R.N. dans les homogénats de reins de Rat.

α H.B.D.H. 1 / 100	μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu par minute.	M	α
L.D.H. 1/500		18,3	0,7
		61,6	10,6
Protéines 1/100	mg par g de tissu frais	140,0	9,3
A.D.N. 1/20		2,22	0,11
A.R.N. 1/50		5,3	0,3

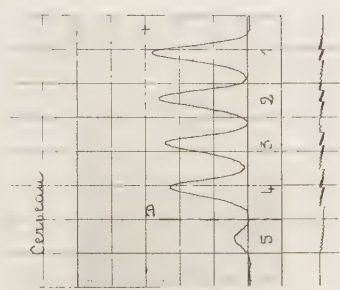
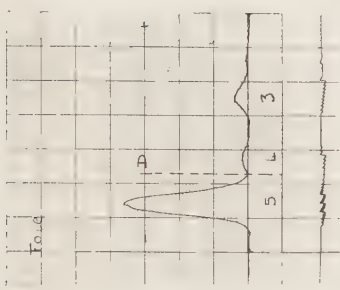
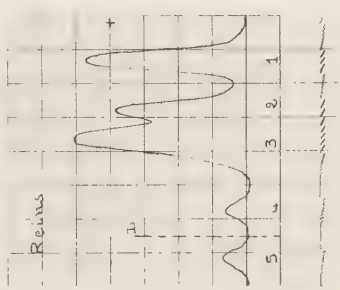
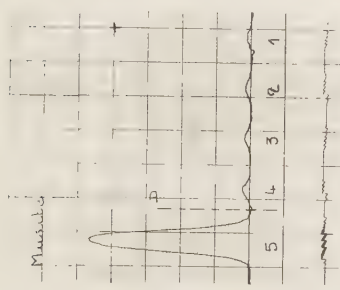
TABLEAU V - Activités enzymatiques (L.D.H., α H.B.D.H.) et taux de protéines A.D.N., A.R.N. dans les homogénats de cerveau de Rat.

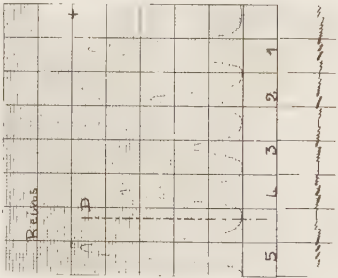
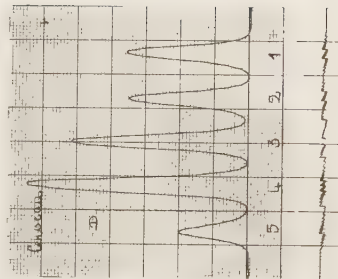
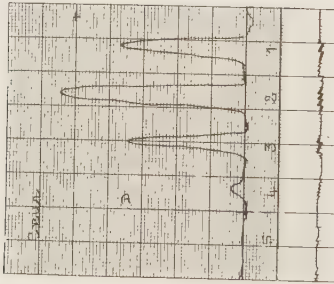
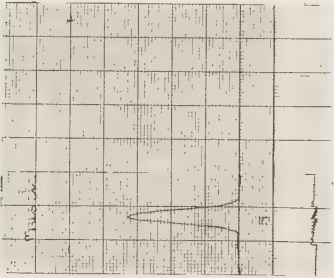
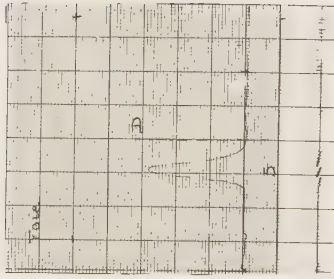
Isoenzymes	5	4	3	2	1
Cerveau	7,3	20,8	21,9	22,9	27,1
Coeur	-	9,8	21,3	41,2	28
Foie	71	10,4	18,6	-	-
Muscle	68	8,5	8,5	8,5	6,8
Reins	6,8	4,7	40,5	18,2	29,8

TABLEAU VI — Répartition exprimée en pourcentage des isoenzymes de l' α -hydroxybutyrate déshydrogénase chez le Rat.



4. HEDN : REPARTITION DES ISOENZYMES
DANS CERTAINS ORGANES DU RAT





LDH : REPARTITION DES ISOENZYMES
DANS CERTAINS ORGANES DU RAT

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

A - Etude des activités enzymatiques globales.

En ce qui concerne l'activité aH.B.D.H. comparée des différents organes, le classement par ordre décroissant peut être établi de la façon suivante : coeur, muscle, foie, reins, cerveau.

L'activité lactate déshydrogénasique fait apparaître un classement sensiblement identique : muscle, coeur, foie, reins, cerveau. Les taux de protéines de ces différents organes sont relativement voisins.

B - Etude des isoenzymes.

Les zymogrammes réalisés pour l' α -H.B.D.H. laissent apparaître une distribution pratiquement identique à celle de la L.D.H. : présence dans le coeur de 5 isoenzymes avec prédominance en isoenzymes rapides; dans le muscle et le foie, il n'y a presque exclusivement que des isoenzymes du type 5 ; enfin, dans le cerveau et les reins, on note la présence des 5 isoenzymes

L'étude des isoenzymes effectuée sur les homogénats de reins avec l' α -cétylbutyrate comme substrat fait apparaître une sixième fraction ; celle-ci serait située entre les fractions 2 et 3 et le pourcentage serait plus élevé que la fraction 3 ; dans tous les cas, il nous a été impossible de dissocier les isoenzymes 3 , 2 et cette bande supplémentaire que nous avons comptée en général avec l'isoenzyme 3.

RINGOIR (114) signale dans le plasma de chien l'existence d'une sixième fraction de L.D.H., fraction qui serait située entre la L.D.H.₁ et la L.D.H.₂ . WIELAND et PFLEIDERER (151) ont étudié chez le Rat la répartition des isoenzymes de la L.D.H. dans les organes précités, nos résultats semblent bien être en accord avec ceux de ces deux auteurs.

D'autre part, la distribution des isoenzymes de la L.D.H. dans les différentes parties de rein de Rat a été étudiée par MATTENHEIMER (80)

celui-ci a montré que la L.D.H.₁ prédominait dans les tubes contournés et dans les zones internes et externes de la médulla, et que la L.D.H.₅ qui ne correspond qu'à 11 % dans les tubes contournés augmentait légèrement pour atteindre environ 70 % dans les papilles. Dans le glomérule, MATTENHEIMER trouve des taux de l'ordre de 48 % pour la L.D.H.₁ et de 25 % pour la L.D.H.₅. Des études similaires ont été faites par le même auteur sur les reins humains et canins.

De même, RICHTERICH et coll. (113) trouvent 5 composants dans l'homogénat total de rein de Rat et montrent que la fraction tubulaire contient essentiellement de l' α_1 L.D.H. et que la fraction glomérulaire contient surtout de la γ -L.D.H.

CONCLUSION.

L'examen de la répartition des activités α -hydroxybutyrate et lactate déshydrogénasiques dans les différents organes du Rat, montre tant pour ces activités enzymatiques globales que pour celles de leurs isoenzymes, des résultats sensiblement parallèles.

CHAPITRE II

LOCALISATION ENZYMATIQUE ET ISOENZYMES

DANS LE COEUR DE RAT.

L'étude de localisation intra-cellulaire des activités enzymatiques : α - hydroxybutyrate déshydrogénasique et lactate déshydrogénasique a été réalisée sur des coeurs de rats mâles de souche Wistar, d'un poids voisin de 200 g et soumis à une alimentation standard équilibrée (Provende U.A.R., eau fraîche à volonté).

CONDITIONS EXPERIMENTALES.

Les coeurs prélevés, pesés sont homogénéisés au 1/10 dans une solution de saccharose 0,25 M selon la technique de POTTER et ELVEHJEN (106). Le fractionnement des homogénats est réalisé dans une centrifugeuse réfrigérée Sorvall RC 2 B. selon HOGEBROOM (56), les différentes fractions sont amenées à la dilution convenable.

Les résultats sont explicités dans le tableau VII où :

- P_1 représente la fraction nucléaire obtenue après 10 minutes de centrifugation à 800 g.
- P_4 représente la fraction mitochondriale obtenue de façon suivante : centrifugation du surnageant S_1 10 minutes à 6000 g ; le sédiment P_2 ainsi obtenu est rehomogénéisé, centrifugé 10 minutes à 19000 g. ; cette nouvelle centrifugation donnera P_3 qui lavé, rehomogénéisé et centrifugé 10 minutes à 19000 g conduira à l'obtention de P_4 '

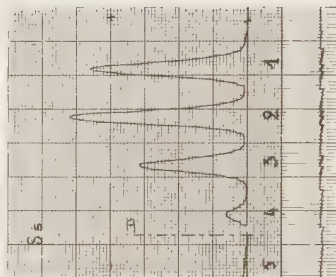
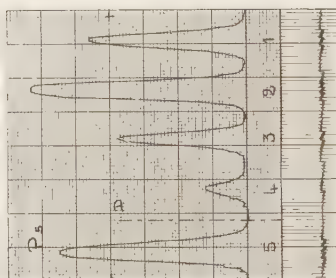
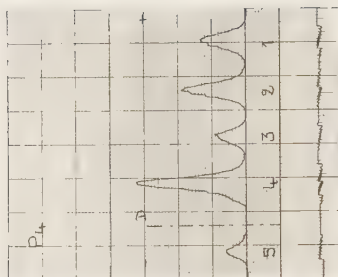
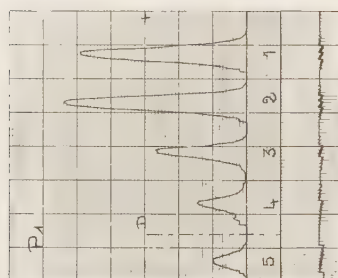
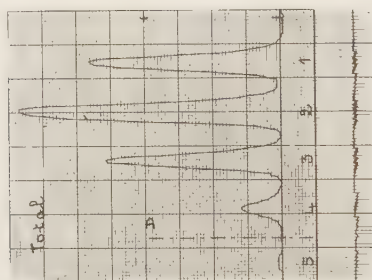
- P_5 et S_5 correspondent aux fractions microsomiales et solubles obtenues par centrifugation à 24 000 g pendant 2 heures des surnageants S_2 , S_3 et S_4 recueillis précédemment.
- T étant l'homogénat total non soumis à la centrifugation différentielle.

Les zymogrammes ont été réalisés sur les différentes fractions avec les deux substrats différents.

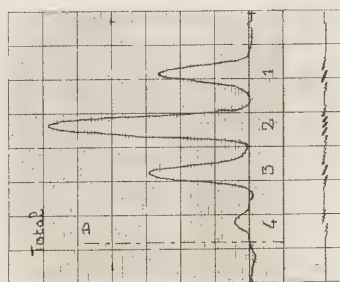
FRACTIONS	L. D. H.		α - H.B.D.H.	
	Micromoles de substrat métabolisé par g. de tissu par minute	α	Micromoles de substrat métabolisé par g. de tissu par minute	α
P ₁	29,3	2,4	4,0	0,5
P ₄	1,2	0,2	0,58	0,06
P ₅	2,8	0,1	1,13	0,15
S ₅	185,2	21,2	58,1	3,8
T	225,6	5,3	82,0	2,6

TABLEAU VII - Activités lactate déshydrogénasique et α -hydroxybutyrate déshydrogénasique de fractions d'homogénats de coeur de Rat.

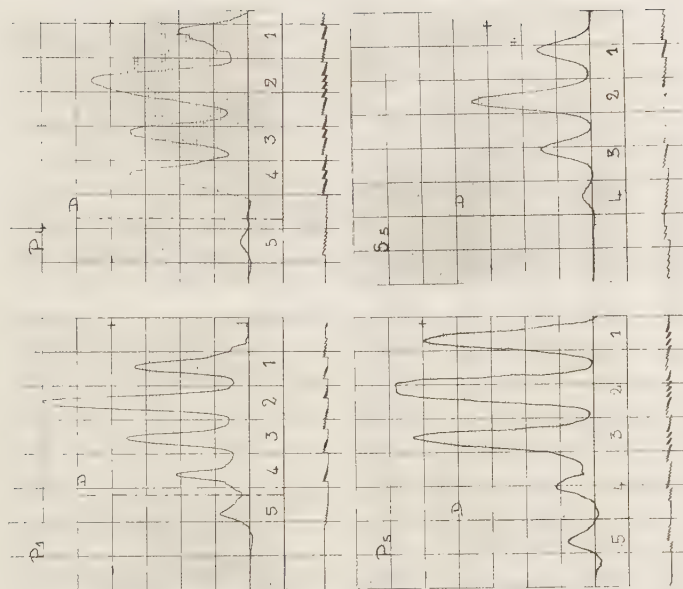
Micromoles de substrat métabolisé par g. de tissu par minute



FRACTIONNEMENT D'UN HOMOGENAT DE
COEUR DE RAT
ISOENZYMES DE LA LDH

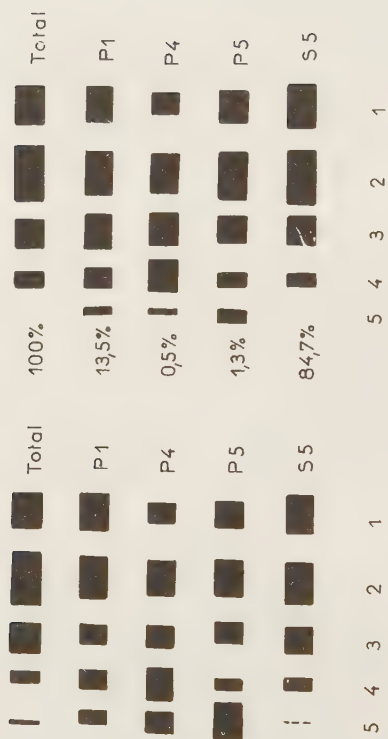


FRACTIONNEMENT D'UN HOMOCENAT DE
COEUR DE RAT
ISOENZYMES DE L' α -HBDH



L.D.H

H.B.D.H



Zymogrammes de fractions de coeurs de Rat

RESULTATS.

A - Activité enzymatique globale.

L'activité enzymatique totale dans le coeur de Rat, se situe en majeure partie (85 %) dans le surnageant S_5 aussi bien pour la L.D.H. que pour l' α - H.B.D.H. J. BASTIDE (7) avait trouvé la même localisation enzymatique dans les reins de Rat.

Par la suite, nous avons effectué des centrifugations plus poussées, après isolement des noyaux et des mitochondries par centrifugation respectives à 900 g puis à 11500 g, nous avons isolé la fraction microsomiale par centrifugation à 170000 g pendant 1 heure ; comme précédemment, nous avons retrouvé la presque totalité de l'activité enzymatique dans le surnageant de cette dernière centrifugation.

B - Etude des zymogrammes.

Si l'on considère les isoenzymes, toutes les fractions ont un profil différent. Alors que dans l'homogénat total et dans S_5 les isoenzymes rapides (1, 2, 3) prédominent ; dans P_1 , P_4 et P_5 apparaissent des quantités importantes d'isoenzymes lentes (en particulier les isoenzymes 4 dans P_4 et 5 dans P_5).

En comparant les zymogrammes de L.D.H. et d' α H.B.D.H., on observe pour les isoenzymes rapides une similitude presque totale, cependant au niveau des isoenzymes lentes quelques différences apparaissent ; ceci peut-être s'expliquer par l'affinité plus faible de ces isoenzymes pour le substrat α -hydroxybutyrate. En effet, d'après PLUMMER et coll. (105) si le rapport α -hydroxybutyrate sur pyruvate est voisin ou égal à 1, pour les isoenzymes rapides, il n'est que de l'ordre de 0,20 pour les isoenzymes lentes.

CONCLUSION :

Chez le Rat, les activités enzymatiques globales envisagées se situent principalement au niveau du surnageant S_5 . L'emploi des deux substrats pour l'étude des isoenzymes nous a donné des résultats identiques en ce qui concerne les rapides ; par contre, quelques différences apparaissent au niveau des lentes.

CHAPITRE III

VARIATIONS ENZYMATIQUES ET ISOENZYMATIQUES EN FONCTION DE L'ÂGE.

Pour étudier les variations enzymatiques en fonction de l'âge, nous avons choisi comme animal d'expérience, la souris (75).

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Les expériences ont été réalisées le jour même de la naissance puis aux âges suivants : 4 jours, 10 jours, 20 jours, 30 jours, 60 jours. Nous n'avons pu obtenir de résultats satisfaisants concernant les embryons, les microtechniques mises en oeuvre n'étant pas suffisamment fines.

Les organes choisis furent le coeur et le rein car dans ces deux organes, nous avons noté la présence des 5 isoenzymes.

Les souris sont sacrifiées par décapitation, le coeur et les reins sont prélevés, homogénéisés, et amenés aux dilutions convenables. Sur les homogénats ainsi réalisés, sont effectués les dosages d'activités enzymatiques explicités dans les tableaux VIII et IX , et les différents zymogrammes utilisant comme substrat le lactate et l' α -hydroxybutyrate de sodium.

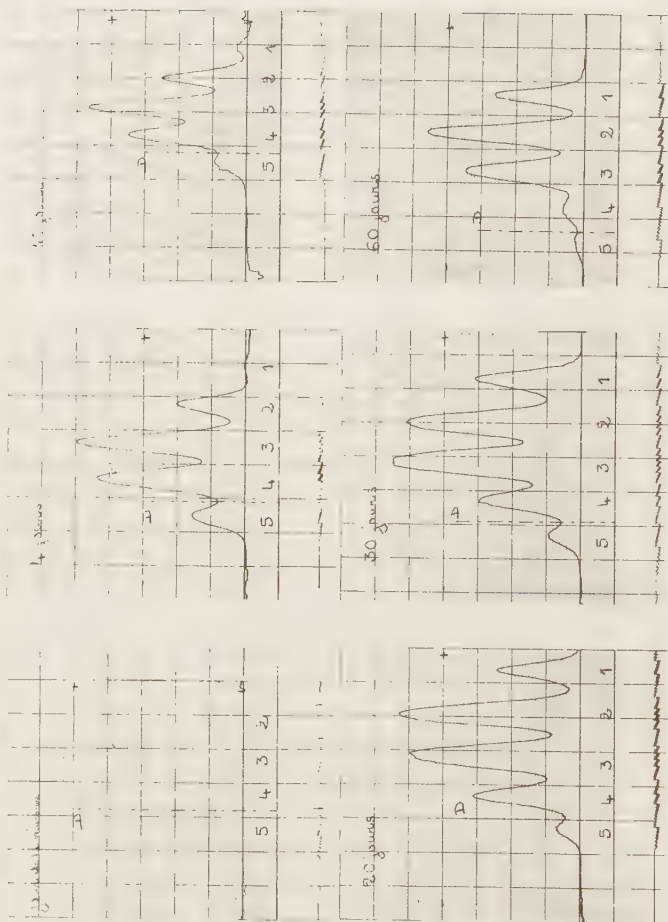
	JOURS	0	4	10	20	30	60
COEUR	μ mole substrat métabolisé/g/mn	73,6	70,5	61,0	56,4	67,7	114,0
	α	14,2	19,0	17,3	15,2	14,3	16,4
REINS	μ mole substrat métabolisé/g/mn	90,5	94,2	72,3	47,5	87,0	104,0
	α	15,9	19,2	15,1	15,4	16,1	12,7

TABLEAU VIII - Activité lactate déshydrogénasique chez la Souris en fonction de l'âge.

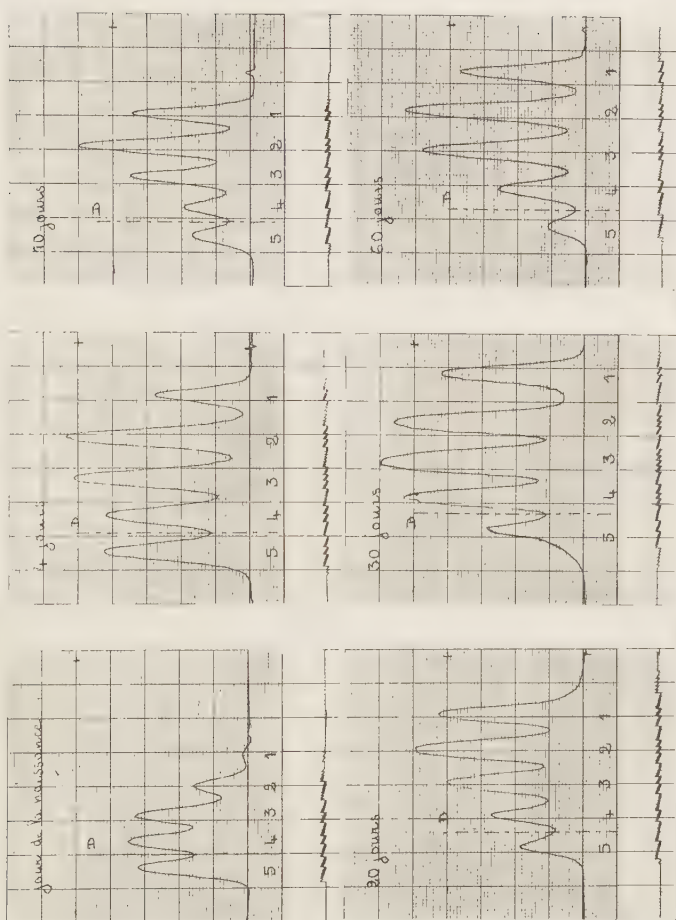
	JOURS	0	4	10	20	30	60
COEUR	μ mole substrat métabolisé/g/mn	20,4	15,3	15,2	17,3	18,5	25,4
	α	6,2	4,9	5,9	3,5	6,7	1,5
REINS	μ mole substrat métabolisé/g/mn	9,7	13,4	19,5	22,7	21,4	33,3
	α	3,4	3,2	2,5	3,7	4,4	2,2

TABLEAU IX - Activité α - hydroxybutyrate déshydrogénasique chez la Souris en fonction de l'âge.

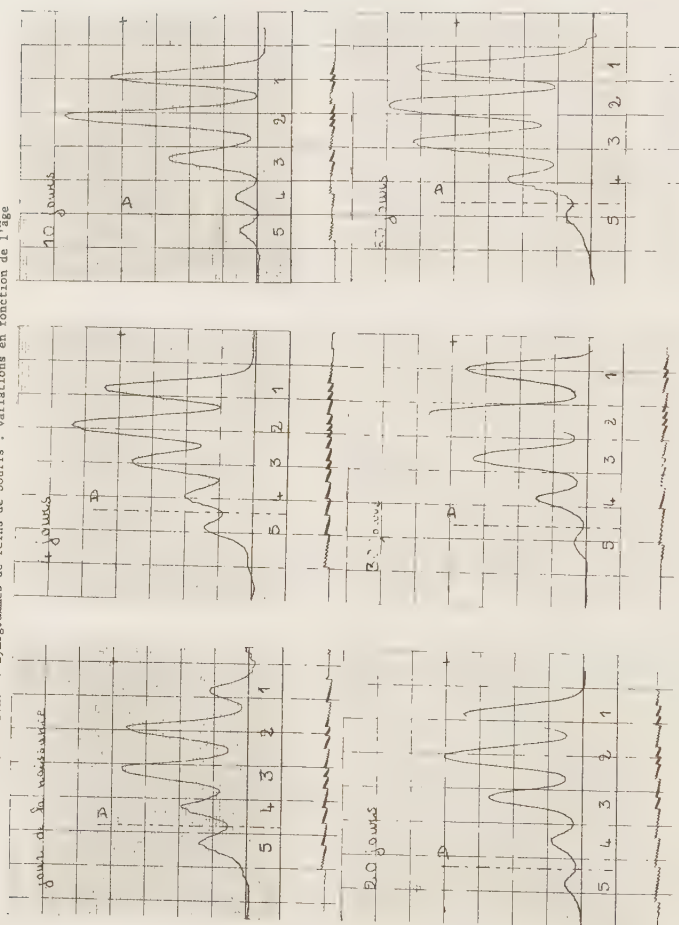
L.D.H. : Zymogrammes de coeur de Souris : Variations en fonction de l'âge



L.D.H. : Zymogrammes de reins de Souris : Variations en fonction de l'âge



α.H.B.D.H. : Zymogrammes de reins de Souris : variations en fonction de l'âge



Dr. H. B. D. H. : Zymogrammes de coeur de Souris : Variations en fonction de l'âge

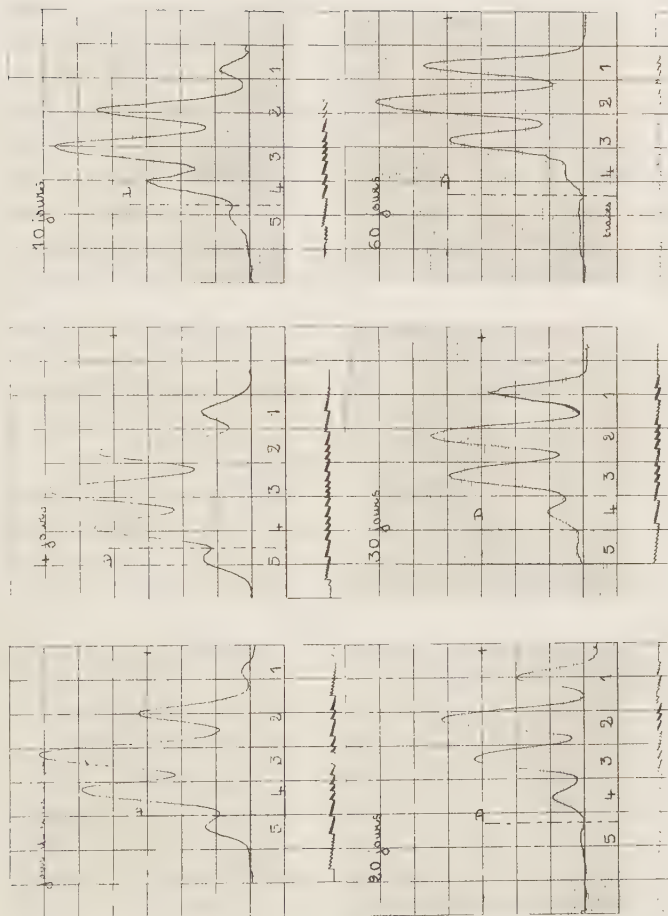


FIGURE I. ISOENZYMES 1 ET 5 DE LA LDH

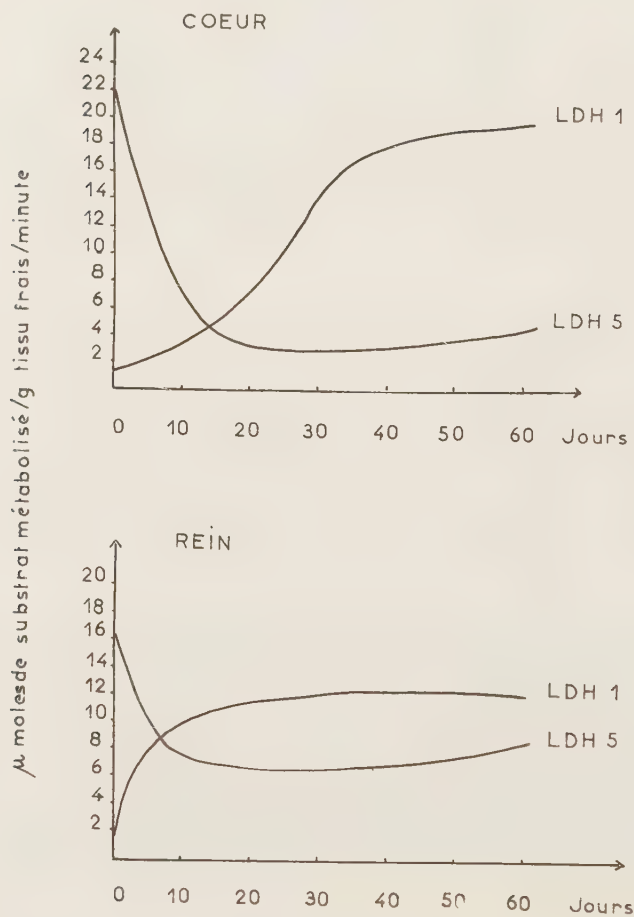
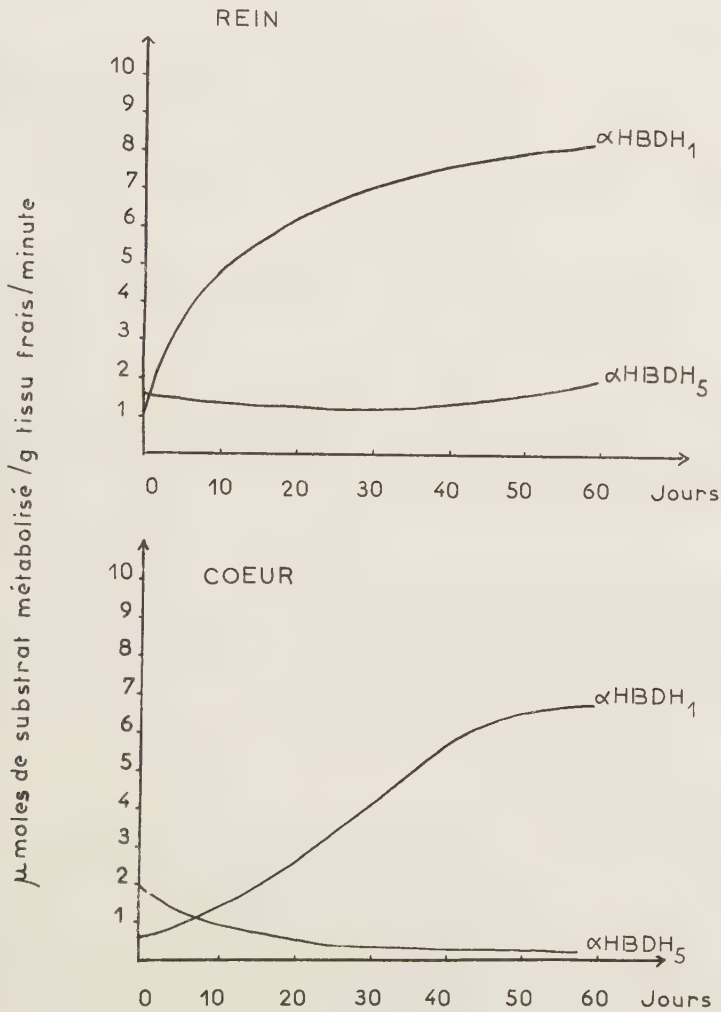


FIGURE II . ISOENZYMES 1 ET 5 DE L' α HBDH



RESULTATS.

A - Activités enzymatiques globales.

L'examen des résultats concernant l'activité lactate déshydrogénasique globale révèle que tant au niveau du coeur qu'à celui des reins, les valeurs restent sensiblement constantes en fonction de l'âge avec cependant une légère dépression entre le 10ème jour et le 20ème jour.

Considérant l'activité α -hydroxybutyrate déshydrogénasique totale, nous notons au niveau du coeur, un taux à peu près constant, sans grandes variations, avec l'âge ; au niveau du rein, apparaît une augmentation progressive de 0 à 60 jours de l'activité. JONADET (60, 61) signale dans la cornée des Bovidés, une activité α -hydroxybutyrate déshydrogénasique plus importante chez l'animal adulte que chez le jeune veau et observe un fait identique concernant l'activité lactate déshydrogénasique.

BASTIDE et coll. (11) confirment une élévation de l'activité de l' α -H.B.D.H. avec l'âge des animaux dans les rétines de Bovidés ; DAS-TUGUE et coll. (24) dans les mêmes rétines de Bovidés, rapportent que l'activité lactate déshydrogénasique peu élevée ne présente que des très faibles variations avec l'âge des animaux.

B - Etude des isoenzymes .

L'étude des zymogrammes effectués avec les homogénats provenant de ces deux organes permet de constater suivant l'âge de grandes différences dans les profils. Les figures I et II précédentes, représentent les variations des isoenzymes 1 et 5 faisant abstraction des isoenzymes 2, 3, 4 qui ne sont que des hybrides des deux types purs 1 et 5. Pour le coeur, à la naissance, les isoenzymes lentes type 5 prédominent largement alors que les rapides, type 1 ne sont qu'à l'état de traces, ceci aussi bien pour la L.D.H. que pour l' α -H.B.D.H.. Ces proportions vont rapidement

tendre à s'équilibrer puis à s'inverser à partir du 15ème jour pour la L.D.H. aux environs du 8ème jour pour l' α -H.B.D.H. Ce n'est qu'au 40ème jour que le phénomène se stabilise.

Ces constatations peuvent être reprises pour le rein. L'équilibre est réalisé pour l' α -H.B.D.H. dès les premiers jours qui suivent la naissance.

A l'âge adulte, les proportions de L.D.H.₁ et de L.D.H.₅ dans le rein sont sensiblement voisines alors que dans le coeur, il y a cinq fois plus de L.D.H.₁ que de L.D.H.₅ ; la même observation se fait pour l' α -H.B.D.H. dans le coeur ; toutefois, dans le rein, les taux α -H.B.D.H.₁ et de 5 sont moins voisins. L' α -H.B.D.H.₁ serait environ 4 fois plus élevée que la 5.

Nous nous sommes demandé si le renversement de sous-unité observé était lié à un rôle métabolique ? Selon PFLEIDERER et WACHSMUTH (104) la L.D.H.₅ se trouve préférentiellement dans les tissus à métabolisme anaérobie tandis que la L.D.H.₁ est surtout présente dans les tissus à métabolisme aérobie.

De plus, STAMBAUGH (140) a montré que les tissus à prédominance L.D.H.₁ étaient adaptés au métabolisme aérobie avec oxydation du pyruvate par le cycle tricarboxylique, car le lactate inhibe cette isoenzyme, tandis que les tissus où la L.D.H.₅ prédomine, ne sont pas inhibés par un excès de lactate et peuvent le stocker. FINE puis MARKER (35, 76) ont suggéré que le relativement faible approvisionnement en oxygène des tissus du fœtus expliquerait la prédominance de L.D.H.₅ . Les constatations faites par GOODFRIEND et KAPLAN (47) puis par CAHN (17) viennent étayer cette hypothèse : sur des cultures de tissus in vitro , la synthèse d'une sous-unité plutôt que de l'autre est sous la dépendance de la concentration en oxygène ; pour de faibles concentration en oxygène il y a synthèse de L.D.H.₅ ; si la concentration en oxygène augmente, il y a synthèse de L.D.H.₁.

CONCLUSION.

Les activités enzymatiques globales étudiées ne paraissent pas subir de variations très importantes en fonction de l'âge. Les isoenzymes présentent eux, un phénomène de bascule, l'isoenzyme 5 qui à la naissance représente environ 90 % de l'activité, décroît pour faire place à l'isoenzyme 1 ; cette inversion paraît liée à la concentration en oxygène du milieu.

CHAPITRE IV

ACTION DU NITRATE D'URANYLE SUR LES ISOENZYMES RENALES ET PLASMATIQUES CHEZ LE RAT.

L'étude de l'action du nitrate d'uranyle sur les phénomènes métaboliques chez le Rat a donné lieu à de nombreux travaux expérimentaux réalisés dans le Laboratoire de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie de la Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand.

Ces travaux ont donné lieu à de nombreuses publications et à la thèse de J. BASTIDE (6) où le lecteur pourra se reporter pour une plus ample bibliographie de la question. En ce qui nous concerne, nous rappellerons que le nitrate d'uranyle exerce chez le Rat une action néphrotoxique. Histochimiquement, on observe au niveau du rein, 24 heures après l'administration des images de tubulo-néphrites épithéliales toxiques avec lésions du parenchyme, altération des parois des tubes contournés, exsudation massive dans les lumières tubulaires. Au niveau des glomérules, il y a simple congestion vasculaire. Les mêmes phénomènes se retrouvent aux différents temps de l'intoxication.

De plus, la néphrite au nitrate d'uranyle s'accompagne d'acidose, d'hépatite, de glucosurie et d'albuminurie.

Les travaux effectués dans ce laboratoire ont porté sur de nombreuses activités enzymatiques rénales après intoxication au nitrate d'uranyle. En ce qui concerne l'activité lactate déshydrogénasique, il est rapporté que les reins de Rat présentent au cours de l'intoxication une baisse modérée de cette enzyme, baisse qui serait de l'ordre de 20 %; alors que les taux de L.D.H. plasmatique ne sont que moyennement élevés aux environs du 3ème jour de l'intoxication. De même, il est noté une baisse très marquée de l' α -H.B.D.H. rénale alors que les taux plasmatiques présentent dès le 1er jour de l'intoxication une forte augmentation de l'activité α -hydroxybutyrate déshydrogénasique.

Il nous a paru intéressant dans le cadre de notre étude de compléter les travaux antérieurs par l'examen des modifications au niveau des isoenzymes.

CONDITIONS EXPERIMENTALES.

Chez le Rat, l'intoxication est réalisée comme cela avait déjà été conduit (6) par injection intra-péritonéale unique de 1 ml par 100 g de poids corporel d'une solution à 2 g/l. de nitrate d'uranyle 6 H₂O dans du sérum physiologique.

Les animaux sont sacrifiés 0 , 24 , 48 , 72 et 96 heures après l'injection ; le sang est prélevé par ponction cardiaque. Les zymogrammes sont alors réalisés sur les homogénats de reins de Rat dilués au 1/50 pour la L.D.H. et au 1/5 pour l' α -H.B.D.H. et sur le plasma.

Il est intéressant de remarquer que les dosages biochimiques avaient été réalisés sur les dilutions d'homogénats de reins au 1/800 pour la L.D.H. et au 1/200 pour l' α -H.B.D.H. ; l'activité α -hydroxybutyrate déshydrogénasique avait été effectuée sur du plasma pur et l'activité lactate déshydrogénasique sur du plasma dilué au 1/10.

Dans les tableaux suivants figurent les variations d'isoenzymes des reins et du plasma exprimées en μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu et par minute ainsi que les différents temps d'intoxication.

ISOENZYMES	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	7,90	6,20	4,86	3,86	1,53
2	4,86	2,26	2,73	3,06	1,53
3	10,70	7,00	6,50	3,86	2,20
4	1,26	1,86	2,06	1,53	1,33
5	1,82	1,86	2,80	1,66	1,66

TABEAU X - a - H.B.D.H. : Variations des isoenzymes des reins de Rat au cours d'intoxications au nitrate d'uranyle exprimées en μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu par minute.

ISOENZYMES	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1		0,032	0,050	0,084	0,064
2		0,030	0,027	0,034	0,010
3		0,045	0,100	0,041	0,038
4				0,010	
5	0,03	0,037	0,041	0,036	0,028

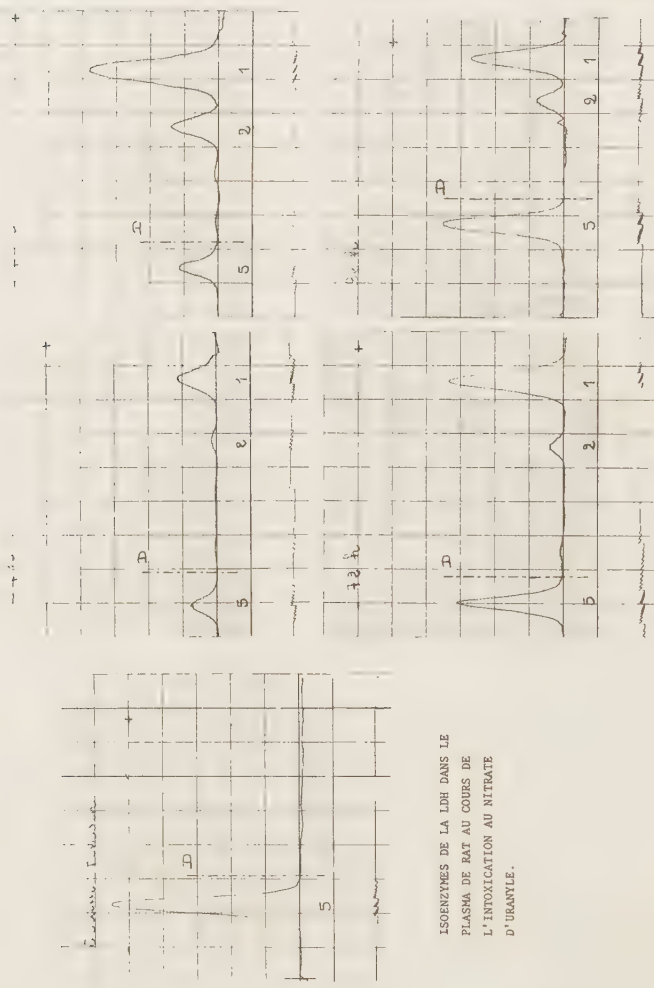
TABLEAU XI - a - H.B.D.H. : Variations des isoenzymes du plasma de Rat au cours d'intoxications au nitrate d'uranyle exprimées en μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu par minute.

ISOENZYMES	0 h	24 h	48 h	72 h.	96 h
1	37,6	30,9	26,1	21,6	22,9
2	28,8	23,4	18,6	9,8	13,6
3	12,5	12,0	11,7	10,9	16,5
4	14,9	15,7	17,8	21,6	22,4
5	43,4	26,6	28,0	41,6	32,2

TABLEAU XII - L.D.H. : Variations des isoenzymes des reins de Rat au cours d'intoxications au nitrate d'uranyle exprimées en μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu frais par minute.

ISOENZYMES	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1		0,360	0,670	0,713	0,600
2		0,160	0,283	0,163	0,263
3		0,530			
4					
5	1,10	0,450	0,210	0,710	0,550

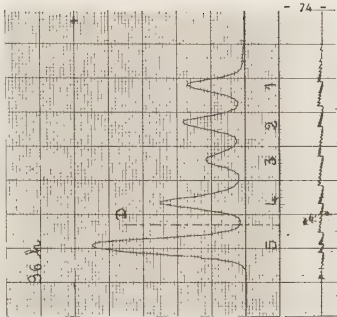
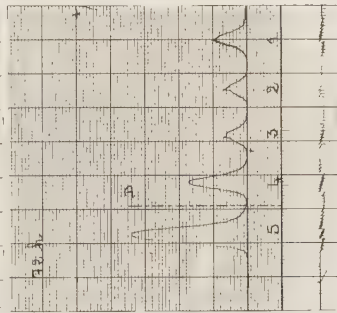
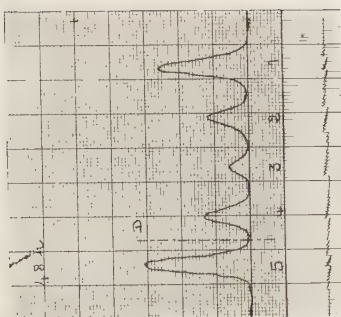
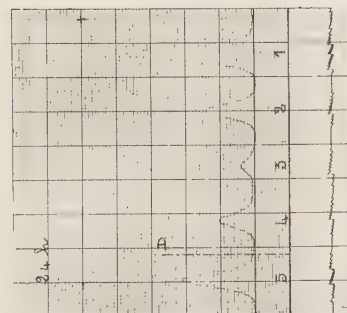
TABLEAU XIII : L.D.H. : Variations des isoenzymes du plasma de Rat au cours d'intoxications au nitrate d'uranyle exprimées en μ moles de substrat métabolisé par gramme de tissu frais par minute.

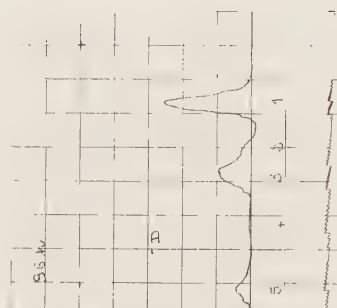
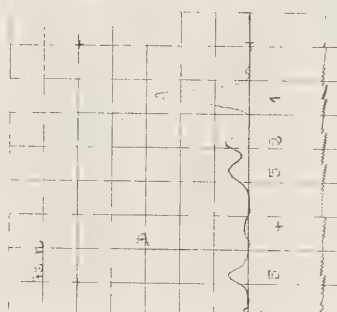
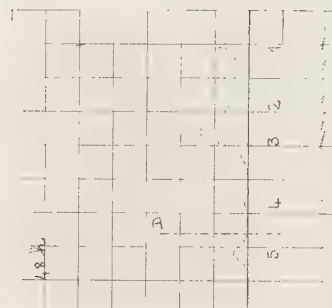
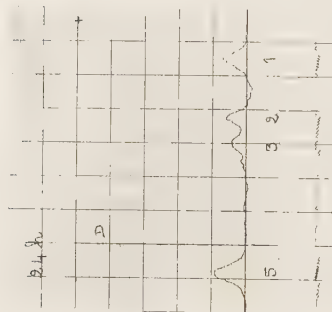
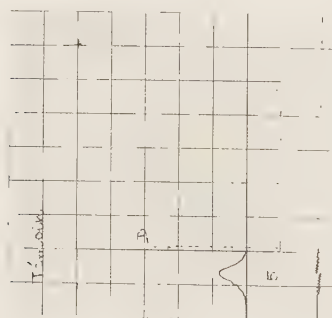


ISOENZYMES DE LA LDH DANS LE
 PLASMA DE RAT AU COURS DE
 L'INTOXICATION AU NITRATE
 D'URANYLE.

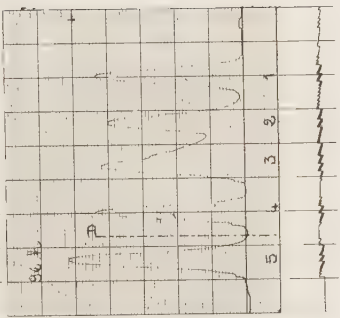
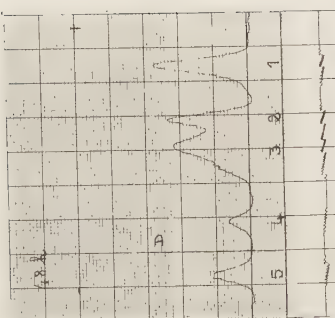
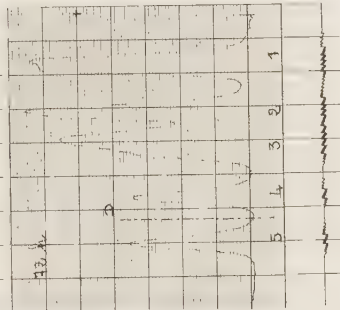
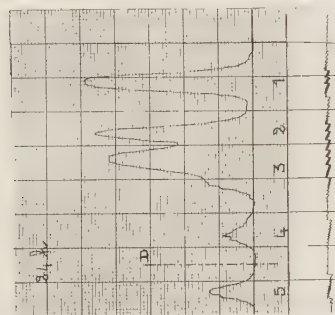
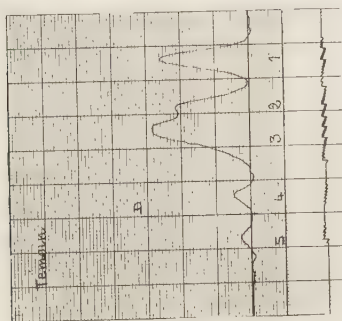


ISOENZYMES DE LA LDH DANS LES
REINS DE RAT AU COURS DE
L'INTOXICATION AU NITRATE
D'URAMYLE.





ISOGENTYMS DE L' α -HBDH DANS LE
PLASMA DE RAT AU COURS DE
L'INTOXICATION AU NITRATE
D'URANYLE.



ISOENZYMES DE L'ALBUMINE DANS LES
REINS DE RAT AU COURS DE
L'INTOXICATION AU NITRATE
D'URANILE.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

A - Activité α -hydroxybutyrate déshydrogénasique :

Au niveau du rein, les isoenzymes 4 et 5 ne semblent pas subir de variations importantes au cours de l'intoxication ; par contre, la teneur en isoenzymes rapides 3 , 2 , 1 diminue considérablement.

Dans le plasma chez le Rat témoin, il n'existe que l'isoenzyme 5. Au cours de l'intoxication au nitrate d'uranyle, on voit apparaître dès la 24ème heure, les isoenzymes 3 , 2 , 1 ; d'autre part, on retrouve dans le plasma, comme dans le rein, la même bande supplémentaire et la même non séparation au niveau des isoenzymes 2 et 3. L'isoenzyme 5 du plasma varie peu, ce qui laisse supposer que les isoenzymes apparues, proviennent des reins ; hypothèse qui paraît confirmée par la présence de la sixième fraction. Il est pensable que la baisse trouvée biochimiquement dans les reins serait due à une fuite des isoenzymes vers le torrent circulatoire, ce qui expliquerait la hausse d'activité α -H.B.D.H. plasmatique.

Il est probable que toutes les isoenzymes des reins passent dans le plasma, mais étant donné la répartition de ces isoenzymes et les techniques employées, nous n'avons pu retrouver l'isoenzyme 4 qu'à la 72ème heure.

B - Activité lactate déshydrogénasique :

Les isoenzymes rénales baissent à peu près toutes à l'exception de la L.D.H.₄ au cours de l'intoxication. La diminution la plus marquée affecte la L.D.H.₁ et la L.D.H.₂.

De même que précédemment, on ne trouve dans le plasma de Rat que de la L.D.H.₅ ; au cours de l'intoxication, il apparaît des isoenzymes rapides ; on note au niveau de la L.D.H.₅ une baisse d'activité.

La présence inhabituelle dans le plasma des isoenzymes 1 et 2 ainsi qu'une diminution de ces mêmes isoenzymes dans les reins permet d'affirmer que ce sont bien des isoenzymes d'origine rénale que l'on retrouve dans le plasma.

Dans le foie de Souris après intoxication au nitrate d'uranyle MAZEAUD (79) trouve une très légère augmentation d'activité lactate déshydrogénasique vers la 48ème heure puis un retour à la normale à la 96ème heure. RINGOIR (114) chez des rats traités au chlorure mercurique trouve dans le plasma des variations isoenzymatiques portant préférentiellement sur la L.D.H.₁ et la L.D.H.₂ qui augmentent vers la 4ème heure.

CONCLUSION

Les zymogrammes effectués avec le lactate et avec l' α -hydroxybutyrate subissent des variations identiques au cours de l'intoxication au nitrate d'uranyle, variations plus sensibles, dans les deux cas, au niveau du plasma où apparaissent dès la 24ème heure, des isoenzymes rapides 1 et 2 d'origine rénale.

RESUMÉ ET CONCLUSIONS.

De nos *Recherches bibliographiques*, nous retiendrons les opinions très diverses en ce qui concerne l'identité de l' α -H.B.D.H. Certains auteurs l'assimilent aux isoenzymes rapides de la L.D.H. dont le dosage éviterait de recourir aux séparations électrophorétiques ; d'autres lui confèrent une identité propre ; d'autres, enfin, pensent que l' α -H.B.D.H. serait en fait la L.D.H. agissant sur un substrat : acide α -cétobutyrique différent de son substrat d'élection : acide pyruvique. Le dosage de l' α -H.B.D.H. trouverait son principal intérêt en Clinique Humaine et plus spécialement dans l'infarctus du myocarde où se produit dès l'attaque une augmentation d'activité qui persiste une dizaine de jours.

Nos *Recherches expérimentales* effectuées en utilisant simultanément les substrats pyruvate et α -cétobutyrate de sodium nous ont permis de comparer la répartition de la L.D.H. et de l'enzyme que nous avons convenu d'appeler α -H.B.D.H. dans le coeur, le foie, les reins, le cerveau et le muscle de Rat ; répartition qui s'est révélée sensiblement parallèle.

L'intérêt porté dans l'infarctus du myocarde sur le dosage de ces activités enzymatiques nous a conduit à étudier leur localisation intracellulaire dans le coeur ; les résultats obtenus ont été identiques avec les

deux substrats, l'activité s'est trouvée localisée à 85 % environ dans le surnageant de centrifugation des microsomes.

Par la suite, nous avons étudié les variations en fonction de l'âge ; ces variations sont similaires avec les deux substrats ; on observe le même phénomène de bascule des isoenzymes lentes dès les premiers jours de la vie au profit des isoenzymes rapides vers l'âge adulte.

Enfin, le nitrate d'uranyle étudié comme effecteur nous a donné des variations isoenzymatiques identiques avec l'acide lactique et l'acide α -hydroxybutyrique ; c'est-à-dire apparition dans le plasma d'animaux traités d'isoenzymes rapides inexistantes dans le plasma normal et d'origine rénale vraisemblablement.

Ces différentes expériences et les résultats parallèles obtenus en utilisant l' α -cétobutyrate et le pyruvate de sodium nous laisseraient supposer que l' α -H.B.D.H. dont on ne trouve pas de substrat naturel, n'existe pas en tant qu'enzyme « *sui generis* ». Il paraît probable que l' α -hydroxybutyrate déshydrogénase et la lactate déshydrogénase sont en fait identiques ; les isoenzymes rapides auraient la même affinité pour les deux substrats ; alors que les lentes auraient une affinité plus grande pour le pyruvate.

Nous nous proposons ultérieurement d'étudier la transformation des deux substrats en présence d'enzymes et d'isoenzymes cristallisées.

Vu, le 27 Septembre 1971

Vu, le 29 Septembre 1971

le Président de Thèse

Le Doyen

P. BASTIDE

M. COULET

Vu et Permis d'Imprimer

N° Ph. 8/71

le 4 Octobre 1971

Le Président d'Université

R. KOHLMULLER

BIBLIOGRAPHIE

-
- 1 - ADAMS H.J., HAAS D.J., JEFFERY B.A., MAC PHERSON A., MERMALL H.L., ROSSMANN M.G., SCHEVITZ R.W., WONACOTT A.J. - J. Mol. Biol., 1969, 41, p. 159.
 - 2 - ADELSTEIN H.J. - Biochemistry, 1965, 4, p. 891.
 - 3 - ANGELINO P.F., VACA G., FERRO G.F., GALLO C. - Minerva Med., 1966, 57, p. 564.
 - 4 - APPELA E., MARKERT C.L. - Biochem. Biophys. Res. Com., 1961, 6, p. 171.
 - 5 - BALINSKI D. - Biochem. Biophys. Acta, 1966, 122, p. 537.
 - 6 - BASTIDE J. - Thèse Doc. Pharmacie, Clermont-Ferrand, 1967.
 - 7 - BASTIDE J., BASTIDE P. - C.R. Soc. Biol., 1968, 162, p. 1492.
 - 8 - BASTIDE J., BASTIDE P., TURCHINI J.P., DASTUGUE G. - Ann. Biol. Clin., 1966, 24, p. 745.
 - 9 - BASTIDE P., BAUDON J., COMBRE A. - Path. Biol., 1968, 16 (21-22), p. 925.
 - 10 - BASTIDE P., BAUDON J., DASTUGUE G., REBIERE J.P. - Ann. Biol. Clin., 1960, 18, p. 307.
 - 11 - BASTIDE P., SOULA M.C., TRONCHE P., DASTUGUE G. - C.R. Soc. Biol., 1966, 160, p. 2322.

- 12 - BERG K.J., ENGER E., BENESTAD H. - Acta Med. Scand., 1966, 180, p. 139.
- 13 - BERGER L., BROIDA D. - Sigma Techn. Bull., 1958, 500, p. 16.
- 14 - BISERTE G. - Path. Biol., 1970, 18 (5-6), p. 261.
- 15 - BURCKHARDT D., LADUE J. - Am. J. Gastroenterol., 1966, 46, p. 43.
- 16 - CABAUD P.G., WROBLEWSKI F. - Amer. J. Clin. Path., 1958, 30, p. 234.
- 17 - CAHN R.D. - Dev. Biol., 1964, 9, p. 327.
- 18 - CAHN R.D., KAPLAN N.O., LEVINE L., ZWILLING E. - Science, 1962, 136, p. 962.
- 19 - CHEDIAK R., BONILLA O. - Rev. Fac. Quim. Farm., 1968, 7, p. 106.
- 20 - CLARKE A.D. - J. Med. Lab. Technol., 1964, 21, p. 21.
- 21 - CLAUVEL M., SCHWARTZ K., CREPIN Y., CACHERA J.P. - Nature, 1968, 220, p. 483.
- 22 - COODLEY E.L. - Angiology, 1965, 16, p. 209.
- 23 - CUTILLO S. , Di TORO R., LUPI L., ANSANELLI V. - Pediatría, 1962, 70, p. 77
- 24 - DASTUGUE G., BALLADE C., BASTIDE P. - C.R. Soc. Biol., 1963, 3 , p. 540.
- 25 - DENBER C.B., MESHEL E., TELLER D., RICHMAN S. - Diseases Nervous System, 1964, 25, p. 724.
- 26 - DISCHE Z. in E. CHARGAFF, J.N. DAVIDSON - The nucleic acids, Academic Press N.Y., 1955, 1 , p. 285.
- 27 - DUBACH V.C., MARGRETH L. - Dent. Med. Wochsch., 1965, 90, p. 1429.
- 28 - DUBE V., HUNTER D.T., KNIGHT J.A. - Am. J. Clin. Path., 1964, 50, p. 491.

- 29 - ELLIOT B.A., JEPSON E.M., WILKINSON J.H. - Clin. Sci., 1962, 23, p. 305.
- 30 - ELLIOT B.A., WILKINSON J.H. - Lancet, 1961, 1, p. 698.
- 31 - ELLIOT B.A., WILKINSON J.H. - Lancet, 1962, 2, p. 71.
- 32 - ELLIOT B.A., WILKINSON J.H. - Clin. Sc., 1963, 24, p. 343.
- 33 - ELODI P. - Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1958, 13, p. 213.
- 34 - EMERSON P.M., WILKINSON J.H. - Brit. J. Haematol., 1966, 12, p. 678.
- 35 - FINE I.H., COSTELLO L.A. - Methods in Enzymology, 1963, 6, p. 958.
- 36 - FISHER H.F., CONN E.E., VENNESLAND B., WESTHEIMER F.H. - J. Biol. Chem., 1953, 202, p. 687.
- 37 - FISHER C.L., NIXON J.C. - Clin. Biochem., 1967, 1, p. 34.
- 38 - FLEURY P., EBERHARD R. - Ann. Biol. Clin., 1951, 9, p. 433.
- 39 - FONDY T.P., EVERSE J. - Ped. Proc., 1964, 23, p. 424.
- 40 - FONDY T.P., EVERSE J., DRISCOLL G.A., CASTILLO F., STOLZENBACH F.E., KAPLAN N.O. - J. Biol. Chem., 1965, 240, p. 4219.
- 41 - FORSTER G. - Schweiz. Med. Wochenschr., 1967, 97, p. 329.
- 42 - FORSTER G., FEISSELI S. - Helv. Med. Acta, 1964, 31, p. 389.
- 43 - FRANK W., HOLTZ E. - Z. Physiol. Chem., 1959, 314, p. 1.
- 44 - FROMM H.J. - Biochim. Biophys. Acta, 1961, 52, p. 199.
- 45 - GARBIN S.- Frascastoro, 1966, 59, p. 722.
- 46 - GIBSON D.M., DAVISSON E.G., BACHKAWAT B.K., RAY B.R., VESTLING C.S. - J. Biol. Chem., 1953, 203, p. 397.
- 47 - GOODFRIEND T.L., KAPLAN N.O. - J. Cell. Biol., 1963, 19, p. 28.
- 48 - GOTTERER G.S. - Biochemistry, 1967, 6, p. 2139.
- 49 - GOTTERER G.S. - Biochemistry, 1967, 6, p. 2147.
- 50 - GREEN D.E., BROSTEAUX J. - Biochem. J., 1936, 30, p. 1489.

- 51 - GUTFREUND H., CANTWELL R., MAC MURRAY C.H., CRIDDLE R.S., HATHAWAY G. - *Biochem. J.*, 1968, 106, p. 683.
- 52 - De La HABA G., LEDER G., RACKER E. - *J. Biol. Chem.*, 1955, 214, p. 409.
- 53 - HAKALA M.T., GLAID A., SCHWERT G.W. - *J. Biol. Chem.*, 1956, 221, p. 191.
- 54 - HEWDRICH F., HULE V., KUTHAN F. - *Ser. Med.*, 1969, 42, p. 153.
- 55 - HOE CELIA M., JABARA A.G. - *J. Comp. Pathol.*, 1967, 77, p.245.
- 56 - HOGEBOM G.H. - *Methods in enzymol.*, 1955, 1, p. 16.
- 57 - IGNATOWSKA H., STACH L. - *Polskie Arch. Med. Wewnetrznej.*, 1966, 37, p. 387.
- 58 - IGNATOWSKA-SWITALSKA H., STACH L., BAR-ANDZIAK E. - *Polskie Arch. Med. Wewnetrznej.*, 1969, 42, p. 627.
- 59 - JOHNSTON H.A., WILKINSON J.H., WITHYCOMBE W.A., RAYMOND S. - *J. Clin. Pathol.*, 1966, 19, p. 250.
- 60 - JONADET M. - Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Clermont-Ferrand, 1967.
- 61 - JONADET M., BASTIDE P., DASTUGUE G. - *C.R. Soc. Biol.*, 1966, 160, p. 995.
- 62 - JONADET M., TURCHINI J.P., BASTIDE P. - *C.R. Soc. Biol.*, 1971, sous presse.
- 63 - JECKEL D. - Thèse de Doctorat, Francfort/Main, 1969.
- 64 - KINGSLEY D.P.E., COOK J., VARTAN A.E. - *Clin. Chim. Acta*, 1965, 12, p. 489.
- 65 - KLEE C.B., SOKOLOFF L. - *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, p. 3880.
- 66 - KNIGHTS E.M. - *Ir. Prog. Clin. Pathol.*, 1966, 1, p. 318.
- 67 - KONTTINEN A., HALONEN P. - *Am. J. Cardiol.*, 1962, 10, p. 525.
- 68 - KONTTINEN A., PYORALA T. - *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1963, 15, p. 429.

- 69 - KONTTINEN A., RAJASALMI M., PALOHEIMO J. - Am. J. Physiol., 1964, 207, p. 385.
- 70 - KROSCH H., NILIUS R. - Z. Gesante Inv. Med. ihre Grenzgeb., 1967, 22, p. 225.
- 71 - KUBOWITZ F., OTT P. - Biochem. Z., 1943, 314, p. 94.
- 72 - KULKA R.G., DUSKIN D. - Biochim. Biophys. Acta, 1964, 91, p. 506.
- 73 - KUN E. - Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25, p. 135.
- 74 - LOEWUS F.A., OFNER P., FISHER H.F., WESTHEIMER F.H., VENNESLAND B. - J. Biol. Chem., 1953, 202, p. 699.
- 75 - MARCOLLET M., VILLIE F., BASTIDE P. - C.R. Soc. Biol., 1970, 164, p. 2031.
- 76 - MARKERT C.L. - in 21 st Symposium of the Society for study of development and Growth. Acad. Press. N.Y., 1963, 65.
- 77 - MARKERT C., MOLLER F. - Proc. Nat. Acad. Sci., 1959, 45, p. 753.
- 78 - MARTIN H. - J. Clin. Pathol., 1963, 16, p. 538.
- 79 - MAZEAUD M.T. - Thèse Doctorat d'Université en Pharmacie, Clermont-Ferrand, 1967.
- 80 - MATTENHEIMER H. - in Enzyme in urine and Kidney Dubach (U.C.) Ed. Berne and Stuttgart, 1968, p. 131.
- 81 - MEADE B.W., ROSALKI S.B. - J. Obstet. Gynaccol. Brit. Commonwealth, 1963, 70, p. 693.
- 82 - MEADE B.W., ROSALKI S.B. - J. Obstet. Gynaccol. Brit. Commonwealth, 1963, 70, p. 862.
- 83 - MEISTER A. - J. Biol. Chem., 1950, 184, p. 117.
- 84 - MEJBAUM W., in E. CHARGAFF , J.N. DAVIDSON - The nucleic acids, Academic Press N.Y., 1955, 1 , p. 301.
- 85 - MELLA K., FOLSCH E., Th. J., FORFF H.J., PFLEIDERER G. - z. Physiol. Chem., 1968, 349, p. 891.

- 86 - MILLAR D.B., SCHWERT G.W. - J. Biol. Chem., 1963, 238, p.3249.
- 87 - MULLER B., HAEUSLE R.M.,- Z. Klin. Chem.Klin. Biochem.,1968, 6, p. 78.
- 88 - NEARMAL C.K., PEARSON C.M. - Am. J. Clin. Path., 1967, 47, p. 594.
- 89 - NIESSEN N.I., RANLOEV P., WEIS-FOGH J. - Brit. Heart. J., 1965, 27, p. 520.
- 90 - NISSELBAUM J.S., BODANSKY O. - J. Biol. Chem., 1961, 236, p. 323.
- 91 - NORNING G., BRAUN H., BOHNDORF W., NAHM H. - Strahlentherapie, 1967, 133, p. 52.
- 92 - NOTARBARTOLO A., FURITANO G., CITARELLA P. - Boll. Soc. Ital. cardiol., 1966, 11, p. 345.
- 93 - NOVOA W.B., SCHWERT G.W. - J. Biol. Chem., 1961, 236, p. 2150.
- 94 - NOVOA W.B., WINER A.D., GLAIDA J., SCHWERT G.W. - J. Biol. Chem., 1959, 234, p. 1143.
- 95 - PAGLIARO L., NOTARBARTOLO A. - Lancet, 1962, 1, p. 1043.
- 96 - PAPAEEVANGELOU G.J., KOUROUKLIS C.B., YOUNIS G.J. - Del-tion Hellinck Mikrobiol. Hyg. Hetaireias, 1966, 11, p. 190.
- 97 - PESCE A., FONDY T.P., STOLZENBACH F., CASTILLO F., KAPLAW N.O. - J. Biol. Chem., 1967, 242, p. 2151.
- 98 - PFLEIDERER G., HOLBROOK J.J., ZAKI L., JECKEL D. - FEBS Letters, 1969, 1 , p. 129.
- 99 - PFLEIDERER G., JECKEL D. - Biochem. Z., 1957, 329, p. 370.
- 100 - PFLEIDERER G., JECKEL D. - Europ. J. Biochem., 1967, 2, p.171.
- 101 - PFLEIDERER G., JECKEL D., WIELAND Th. - Biochem. Z., 1958, 330, p. 296.
- 102 - PFLEIDERER G., JECKEL D., WIELAND Th. - Ach. Biochem. Biophys., 1959, 83, p. 275.

- 103 - PFLEIDERER G., MELLA K. - FEBS Meeting, Prague, 1968.
- 104 - PFLEIDERER G., WACHSMUTH E.D. - Biochem. Z., 1961, 334, p. 185.
- 105 - PLUMMER D.T., ELLIOTT B.A., COOKE K.B., WILKINSON J.H., Biochem. J., 1963, 87, p. 416.
- 106 - POTTER H.R., ELVEHJEN C.A. - J. Biol. Chem., 1936, 14, p.495.
- 107 - PRESTON J.A., BATSAKIS J.G., BRIERE R.O. - Am. J. Clin. Path. 1964, 41, p. 237.
- 108 - Pyridine Nucleotide Dependent Deshydrogenases, Horst Scend Ed. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg New-York, 1970.
- 109 - RAJEWSKY K. - Biochem. Biophys. Acta, 1966, 121, p. 51.
- 110 - RENAIS J., SCEBAT L. - Ann. Biol. Clin., 1960, 18, p. 7.
- 111 - RENAIS J., SCEBAT L. - Path. Biol., 1970, 18 (5-6), p. 275.
- 112 - RENAIS J., SCEBAT L., LENEGRE J. - Arch. Mal Coeur, 1965, 58, (3), p. 317.
- 113 - RICHTERICH R., SCHAFFROTH P., FRANZ H.E. - Enzymol. Biol. Clin., 1962, 1, p. 114-122.
- 114 - RINGOIR S. - in Enzymes in urine and Kidney Dubach V.C. Berne, 1968, p. 156.
- 115 - RIORDAN J.F. ; WACKER W.E.C., VALLEE B.L. - Biochem., 1965, 4, p. 1758.
- 116 - De RITIS L. - Rev. Clin. Pediat., 1965, 75, p. 34.
- 117 - De RITIS L. - Rev. Clin. Pediat., 1965, 76, p. 26.
- 118 - ROSALKI S.B. - J. Clin. Path., 1962, 15, p. 156.
- 119 - ROSALKI S.B. - Clin. Chim. Acta, 1963, 8, p. 415-417.
- 120 - ROSALKI S.B., WILKINSON J.H. - Nature, 1960, 188, p. 1110.
- 121 - ROSALKI S.B., WILKINSON J.H. - Brit. Heart, 1963, 25, p. 795.
- 122 - Di SABATO G., KAPLAN N.O. - Biochemistry, 1963, 2, p. 776.
- 123 - SANWALD R., KIRK J.E. - Nature, 1966, 209, p. 912.

- 124 - SCHAPIRA F. - Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1965, 10, p. 259.
- 125 - SCHATZMANN H.J. - Biochem. Biophys. Acta, 1965, 94, p. 89.
- 126 - SCHELLENBERG K.A. - J. Biol. Chem., 1965, 240, p. 1165.
- 127 - SCHNEIDER K.W., HEISE E.R., LEHMANN F.G. - Verhandl. Dent. Oes. Lim. Med., 1963, 69, p. 182.
- 128 - SCHNEIDER K.W., HEISE E.R., LEHMANN F.G. - Enzymol. Biol. Clin., 1964, 4, p. 1.
- 129 - SCHNEIDER K.W., LEHMANN F.G., HORNUNG G. - Arch. Kreislaufforsch, Beith. Z. Kreislaufforsch, 1965, 46, p. 306.
- 130 - SCHNEIDER K.W., LEHMANN F.G. - Enzymol. Biol. Clin., 1966, 6, p. 25.
- 131 - SCHWARTZ K., CLAUVEL DE MENDOCA M. - Ann. Biol. Clin., 1969, 27, p. 461.
- 132 - SCHWERT G.W., MILLER B.R., PEANASKY R.J. - J. Biol. Chem. 1967, 242, p. 3245.
- 133 - SCHWERT G.W., Pyridine nucleotide dependent deshydrogenases, Horst Scend Ed., Springer Verlag Berlin, Heidelberg New-York, 1970, p. 139.
- 134 - De SIBRIK I., O'DOHERTY D.S. - Neurology, 1963, 13, p. 554.
- 135 - SIGMA Bull., 1963, n° 20.
- 136 - SIGMA Bull., 1964, n° 495.
- 137 - SITZMANN F.C. - Z. Kinderkeilk, 1966, 97, p. 291.
- 138 - SMITH A.F. - Lancet, 1967, 2, p. 178.
- 139 - SPECTOR I., FARLAND M., TRUJILLO N.P., TICKTIN H.E. - Enzymol. Biol. Clin., 1966, 7, p. 78.
- 140 - STAMBAUGH R., POST D. - Biochim. Biophys. Acta, 1966, 122, p. 541.
- 141 - STIRNEMANN U., STIRNEMANN H., RICHTERICH R., I AUND-SGAARD-HAUSEN P., AUGUSTIN E., DANVERT I., SCHULGEN C.-Enzymol. Biol. Clin., 1967, 8, p. 7.

- 142 - STIZMANN F.C. - Med. Klin., 1967, 62, p. 1332.
 - 143 - TAKANEDA Y., SCHWERT G.W. - J. Biol. Chem., 1956, 223, p. 157.
 - 144 - TAUBER H. - The chemistry and Technology of enzymes, Wiley and Sons Ed., 1949, p. 187.
 - 145 - THUNBERG T. - Skand Arch. Physiol., 1920, 40, p. 1.
 - 146 - TURCHINI J.P., BASTIDE P. - C.R. Soc. Biol., 1967, 161, p.1986.
 - 147 - VACCA G., TROVATI C. - Minerva Med., 1966, 57, p. 586.
 - 148 - WEILL J., VERBE R., MOREL J.J. - Rev. Med. Tours, 1965, 6 , p. 497.
 - 149 - WELBOURN N., MELROSE D.G., MOSS D.W. - J. Clin. Path., 1966, 19 , p. 220.
 - 150 - WIELAND Th., GEORGOPOULOS D., KAMPE H., WACHSMUTH E.D. - Biochem. Z., 1964, 340, p. 483.
 - 151 - WIELAND Th., PFLEIDERER G. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 1961, 94, p. 691.
 - 152 - WIEME R.J. - Lancet, 1962, 2, p. 304.
 - 153 - WILKINSON J.H. - Proc. Roy. Soc. Med., 1963, 56, p. 177.
 - 154 - WILKINSON J.H., WITHYCOMBE W.A. - Biochem. J., 1964, 93, p. 11.
 - 155 - WINER A.D. - Acta Chem. Scand., 1963, 17, p. 5203.
 - 156 - WINER A.D., SCHWERT G.W. - J. Biol. Chem., 1957, 231, p.1065.
 - 157 - WINER A.D., SCHWERT G.W. - J. Biol. Chem., 1958, 231, p.1065.
 - 158 - WINER A.D., SCHWERT G.W. - J. Biol. Chem., 1959, 234, p.1155.
 - 159 - WOENCKHAUS CHR. BERGHAUSER J., PFLEIDERER G. - Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 1969, 350, p. 473.
-

TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION	1
RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES	5
- Chapitre I - La lactate deshydrogénase et ses isoenzymes Structure et mécanisme d'action	7
- Chapitre II - Deshydrogénation de l'acide α -hydroxybutyrique	19
- Chapitre III - Intérêt clinique de la détermination de la lactate déshydrogénase et de l' α -hydroxybutyrate	23
RECHERCHES EXPERIMENTALES	33
- A - Méthodes expérimentales	
- Chapitre I - Dosages des activités enzymatiques	39
- Chapitre II - Séparation des isoenzymes	43
- Chapitre III - Dosages des acides desoxyribonucléique et ribonucléique	49
- Chapitre IV - Dosages des protéines biurétiques	53

B - Résultats expérimentaux.

- Chapitre I -

Répartition comparée de l' α -hydroxybutyrate et de la lactate deshydrogénase et de leurs isoenzymes dans les différents organes chez le Rat	57
---	----

Chapitre II -

Localisation enzymatique et isoenzymes dans le coeur de Rat	69
---	----

Chapitre III -

Variations enzymatiques et isoenzymatiques en fonction de l'âge	77
---	----

Chapitre IV -

Action d'un effecteur nitrate d'uranyle sur les isoenzymes rénales et plasmatiques chez le Rat	89
--	----

RESUME ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	103
---------------------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	107
---------------------	-----
